



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DAS VARIAÇÕES NO METABOLISMO GLUCÍDICO EM GATOS
DOMÉSTICOS COM NEOPLASIA MAMÁRIA

CATARINA SEIÇA NEVES ROLDÃO VIEIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho

Vogais

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes Vítor
Villa de Brito
Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

ORIENTADOR

Doutora Maria Teresa da Costa
Mendes Vítor Villa de Brito

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DAS VARIAÇÕES NO METABOLISMO GLUCÍDICO EM GATOS
DOMÉSTICOS COM NEOPLASIA MAMÁRIA

CATARINA SEIÇA NEVES ROLDÃO VIEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho
Doutora Maria Teresa da Costa Mendes
Vitor Villa de Brito
Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

ORIENTADOR

Doutora Maria Teresa da Costa
Mendes Vítor Villa de Brito

2011

LISBOA

*“Os meus olhos são os meus olhos,
E é com esses olhos uns
que eu vejo no mundo escolhos
onde outros, com outros olhos,
não vêem escolhos nenhuns.*

*Quem diz escolhos diz flores.
De tudo o mesmo se diz.
Onde uns vêem luto e dores
uns outros descobrem cores
do mais formoso matiz.
(...)*

*Inútil seguir vizinhos,
querer ser depois ou ser antes.
Cada um é seus caminhos.
Onde Sancho vê moinhos
D. Quixote vê gigantes.*

*Vê moinhos? São moinhos.
Vê gigantes? São gigantes.”*

António Gedeão

*Ao meu avô Etur e à minha avó Virgínia,
Aos meus tios avós, Tio Paulo e Titi,
Ao seu amor eterno e incondicional...*

AGRADECIMENTOS

A todos os animais da minha vida, que despoletaram em mim a minha eterna paixão e, em particular, ao Sebastião, que tornou esse amor mais concreto.

Aos meus avós e tios-avós, pelos valores e princípios basilares que me transmitiram, pela segurança e conforto que me deram, por me amarem sem condições.

À minha mãe, porque está sempre lá, porque atravessámos juntas estes anos nem sempre fáceis, porque respeitou sempre o meu tempo, as minhas lutas, e nunca me faltou. Ao meu pai, pelos seus ideais e por me ter tornado uma pessoa forte e independente, por me ter ensinado a lutar pelas minhas convicções.

À Mariana, com quem aprendi desde cedo a dimensão real da palavra irmã. Por ser o meu maior refúgio e nunca me deixar esquecer que o mundo é muito maior.

Às amigas de sempre, pelo que já éramos antes, porque se mantiveram, porque acreditam nas minhas capacidades, às vezes mais do que eu, e porque me conhecem como poucos.

Aos colegas e amigos de faculdade, com quem criei memórias inesquecíveis e que fizeram com que esta fase valesse a pena, mesmo nos momentos mais difíceis. Em particular, à Joana e à Mariana, porque temos uma loucura diferente, porque formamos o Trio! Sinto-me uma privilegiada por ter contado com a vossa amizade e companhia constante ao longo destes 7 anos.

Aos amigos do grupo de S.Pedro de Moel que, muito embora quase só nos encontremos nas férias, me fazem um bem sem tamanho. Em particular, aos meus primos, ao meu “maninho” e ao Zé por me fazerem sempre sentir em casa, e à minha prima Verónica pelo carinho sincero e pela enorme ajuda na realização do trabalho estatístico.

Aos bons professores que tive a oportunidade de conhecer ao longo do meu percurso académico, àqueles que me formaram enquanto aluna e enquanto pessoa.

A todos os meus colegas de estágio, que tornaram essa etapa mais fácil e divertida, pelo respeito e companheirismo genuíno, porque sabíamos funcionar como um todo.

À D.Edite, à Rute e à Rita por toda a ternura e por tornarem o bar um abrigo para onde eu podia sempre fugir.

Ao Hospital da FMV-UTL, a todos os seus médicos e auxiliares, pela enorme disponibilidade, cooperação e simpatia, pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos, pelos momentos de diversão e descontração. Em particular aos médicos mais novos, aos Ricardos, ao António, à Marisa, ao Rodolfo, à Leonor e à Joana que, ainda não podendo ser orientadores, me apoiaram como se o fossem, disponibilizando-me toda ajuda, não deixando por isso de me tratar com enorme amizade e horizontalidade. Ao Dr. Gonçalo e ao grupo de cirurgia pelo pronto auxílio na realização das colheitas de sangue.

À LPDA pela ajuda valiosa na obtenção de amostras. Em particular, ao Dr. Gonçalo, à Dr.^a Célia, à Dr.^a Teresa, à Dr.^a Marta e à Carla, pela enorme disponibilidade, simpatia e boa-disposição.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UTL pelo material facultado e pela realização gratuita dos exames histopatológicos requeridos na elaboração do estudo.

À Professora Doutora Luísa Mateus pelo auxílio na realização dos testes de insulina e pela bibliografia disponibilizada. Ao Professor Doutor Jorge Correia pela ajuda na obtenção de fotografias dos cortes histopatológicos. Ao Professor Doutor Mário Quaresma pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e correcções.

Aos animais do meu estudo e aos seus donos pela sua compreensão e cooperação.

Em especial e, por isso, por último, à Professora Doutora Teresa Villa de Brito, a minha orientadora, que já o era mesmo antes de o sabermos e a quem estarei eternamente grata. Agradeço toda a liberdade que me deu, aliada ao apoio incondicional que sempre me transmitiu, permitindo-me traçar o meu próprio caminho em segurança. Obrigada por tudo o que me proporcionou, obrigada pela atenção, pela dedicação, pelo carinho, pela enorme confiança e por tudo o que fica para além disso, só espero ter sido sempre capaz de retribuir dentro do mesmo nível de grandeza.

Estudo das variações no metabolismo glucídico em gatos domésticos com neoplasia mamária

Diversas evidências epidemiológicas e observações experimentais sugerem que, níveis elevados de glicose, insulina e IGF no sangue podem ter um papel relevante na carcinogênese mamária. Alguns autores consideram, ainda, a possibilidade de uma relação significativa entre as concentrações aumentadas destes factores e um pior prognóstico.

Vários estudos, no homem, têm pesquisado a existência de uma relação directa significativa entre a diabetes mellitus e os tumores mamários. Contudo, ainda pouco tem sido feito para determinar, concretamente, a influência dos diferentes parâmetros do metabolismo glucídico nesta associação. Assim, o presente estudo procurou analisar as concentrações sanguíneas de insulina e glicose em dez gatas domésticas com carcinoma mamário, e tentou também estabelecer uma relação entre os valores registados e a gravidade do tumor apresentado.

Com recurso a duas colheitas de sangue, uma pré-cirúrgica e outra pós-cirúrgica, e após a medição dos respectivos níveis de glicose, frutossamina e insulina, observou-se que, 10% dos animais apresentava uma hiperglicémia ligeira e outros 10% manifestava uma hiperinsulinémia marcada. Os valores registados demonstraram ainda, uma redução generalizada da concentração de glicose sanguínea após extirpação da massa neoplásica. Com base nos resultados histopatológicos obtidos, foi possível estabelecer uma correlação negativa significativa entre os valores de glicémia pós-cirúrgicos e a dimensão do tumor e uma correlação positiva significativa entre os níveis de frutossamina pré-cirúrgicos e a malignidade do tumor.

A incidência, ainda que baixa, de níveis aumentados de glicémia e insulinémia neste estudo, suporta a hipótese de uma associação entre estes factores e o desenvolvimento de neoplasias mamárias. As variações observadas nos níveis de glicose e frutossamina, e a correlação negativa entre os valores glicémicos pós-cirúrgicos e a dimensão do tumor apontam para um consumo glucídico excessivo por parte das células neoplásicas. Uma possível relação entre os níveis sanguíneos de glicose e insulina e os diferentes parâmetros usados na classificação da gravidade do tumor é também sustentada neste trabalho.

Apesar do reduzido número de casos considerados nesta pesquisa, a pertinência dos resultados obtidos e escassez de estudos sobre o tema nesta espécie valoriza o seu interesse e incentiva a realização de futuras investigações.

Palavras-chave: Glicose, insulina, frutossamina, neoplasia mamária, metabolismo glucídico.

ABSTRACT

Title: Study on glucidic metabolism changes in cats with mammary neoplasia.

Several epidemiological evidences and empirical observations suggest that high glucose, insulin and IGF levels in the blood may have an important role in the mammary carcinogenesis. Some authors consider yet the possibility of a significant relation between the increased concentration of these factors and a worse prognosis.

Several studies, in humans, have been researching a meaningful direct relation between diabetes mellitus and mammary tumours. However, little has been done to determine effectively the influence of the different glucidic parameters in this association. So, this study tried to analyse the blood concentration of insulin and glucose in ten household cats with mammary carcinoma. And it also tried to establish a relation between the recorded values and the seriousness of the tumour. After taking two blood samples, one pre-surgical and another post-surgical, and after measuring their glucose, fructosamine and insulin levels, it was seen that 10% of the animals had a slight hyperglycaemia and other 10% had an acute hyperinsulinemia. The recorded values also showed a generic increase of the blood glucose concentration before surgery and a decrease of this parameter after the removal of the neoplasm. Based on the histopathological results, it was possible to establish a significant negative correlation between the post surgical glycaemia values and the tumour size and a significant positive correlation between the pre-surgical fructosamine levels and the malignancy of the tumour.

The incidence, despite being low, of increased glycemia and insulinemia levels in this study, supports the hypothesis of an association between these factors and the development of mammary neoplasias. The variations in the glucose and fructosamine levels, and the negative correlation between the glycemic post surgical values and the tumour's size point to an excessive glucidic consumption by the neoplastic cells. A possible relation between the glucose and insulin values in the blood and the different parameters used in classifying the seriousness of the tumour is also supported in this study.

Despite the small number of cases analyzed in this research, the relevance of the results and the shortage of studies on this subject, increases its interest and stimulates further researches.

Keywords: Glucose, insulin, fructosamine, mammary neoplasia, glucidic metabolism.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE GERAL	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR.....	XV
I. INTRODUÇÃO	1
II. ESTUDO DAS VARIAÇÕES NO METABOLISMO GLUCÍDICO EM GATOS DOMÉSTICOS COM NEOPLASIA MAMÁRIA.....	3
1. METABOLISMO GLUCÍDICO	5
1.1 HOMEOSTASE GLÚCIDICA	5
1.2 GLICOGÉNIO	5
1.3 PRINCÍPIOS GERAIS DO METABOLISMO GLUCÍDICO.....	7
1.3.1 Principais fontes e destinos.....	7
1.3.2 Transportadores de glicose	8
1.3.3 Principais vias metabólicas	8
1.3.3.1 Glicogénese	8
1.3.3.2 Glicogenólise	9
1.3.3.3 Regulação do metabolismo do glicogénio.....	10
1.3.3.4 Glicólise.....	11
1.3.3.5 Gliconeogénese	12
1.3.3.6 Regulação recíproca da glicólise e da gliconeogénese.....	13
1.4 HORMONAS GLUCORREGULADORAS	14
1.4.1 Principais hormonas	14
1.4.1.1 Insulina	14
1.4.1.1.1 Estrutura	15
1.4.1.1.2 Síntese.....	15
1.4.1.1.3 Secreção de insulina e do péptido C.....	16
1.4.1.1.4 Regulação da secreção de insulina	16
1.4.1.1.4.1 - Carbohidratos	16
1.4.1.1.4.2 - Aminoácidos.....	16
1.4.1.1.4.3 - Ácidos gordos/ triglicéridos	17
1.4.1.1.4.4 - Hormonas gastrointestinais.....	17
1.4.1.1.4.5 - Outras hormonas e o sistema nervoso autónomo	17

1.4.1.1.5 Activação dos receptores celulares de insulina	18
1.4.1.1.6 Inactivação da insulina	19
1.4.1.1.7 Principais funções metabólicas da insulina	19
1.4.1.1.7.1 - Efeitos no fígado	19
1.4.1.1.7.2 - Efeitos no músculo	19
1.4.1.1.7.3 - Efeitos no tecido adiposo	20
1.4.1.1.7.4 - Efeitos no metabolismo proteico e no crescimento	20
1.4.1.1.8 Factor de crescimento semelhante à insulina (IGF / somatomedina)	20
1.4.1.2 Glucagina	22
1.4.2 Outras hormonas	23
1.4.2.1 Somatostatina	23
1.4.2.2 Amilina	23
1.4.2.3 Catecolaminas	24
1.4.2.4 Glicocorticóides	24
1.4.2.5 Hormona de crescimento (GH)	25
1.4.2.6 Progesterona	25
1.4.2.7 Hormonas da tiróide	26
1.5 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO GLUCÍDICO	26
1.5.1 Determinação de glicémia	26
1.5.2 Glicosúria	27
1.5.3 Proteínas glicadas	28
1.5.3.1 Hemoglobina glicada	28
1.5.3.2 Frutosamina	29
1.5.4 Medição da insulinémia	30
1.5.5 Testes de tolerância	31
1.5.5.1 Teste de tolerância à glicose	31
1.5.5.1.1 Via oral	31
1.5.5.1.2 Via endovenosa	32
1.5.5.2 Teste de tolerância à insulina	32
1.5.5.3 Teste de estimulação do glucagina	32
1.5.5.4 Teste de tolerância à adrenalina	33
 2. INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES GLUCÍDICAS NO TUMOR MAMÁRIO	 34
2.1 FACTORES DE RISCO COMUNS À DIABETES TIPO II E AO TUMOR MAMÁRIO	34
2.1.1 Idade	35
2.1.2 Actividade física	35
2.1.3 Obesidade	36
2.1.3.1 Hormonas sexuais	36
2.1.3.2 Adipocinas	37
2.1.3.3 Citocinas	37
2.2 FACTORES DE RISCO INDEPENDENTES RESULTANTES DO METABOLISMO GLUCÍDICO	38
2.2.1 Hiperinsulinémia	38
2.2.1.1 Acção directa através dos receptores de insulina	39
2.2.1.1.1 Substratos dos receptores de insulina	40
2.2.1.2 Outras acções da insulina	40
2.2.1.2.1 Hormonas sexuais	41

2.2.1.2.2 Sistema IGF	42
2.2.1.2.2.1 Receptores híbridos insulina / IGF	43
2.2.2 Hiperglicémia	44
2.2.2.1 Mecanismos de acção da hiperglicémia nos tumores mamários.....	45
2.3 POSSÍVEL INFLUÊNCIA DA TERAPÊUTICA DE DIABETES EM TUMORES MAMÁRIOS	46
2.3.1 Agentes orais hipoglicémicos	46
2.3.1.1 Sulfonilureias	46
2.3.1.2 Biguanida metformina	47
2.3.1.3 Tiazolinas	48
2.3.2 Análogos de insulina	48
2.4 POSSIBILIDADE DE UMA ASSOCIAÇÃO INVERSA	49
3. TRABALHO EXPERIMENTAL	51
3.1. OBJECTIVOS DO ESTUDO	52
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.2.1. Animais	52
3.2.2. Critérios de exclusão	53
3.2.3. Anamnese	53
3.2.4 Exame físico	53
3.2.5 Hemograma e análises bioquímicas	53
3.2.6 Exame radiográfico torácico.....	53
3.2.7 Estadiamento clínico do tumor	54
3.2.8 Exame histopatológico	54
3.2.9 Medição de glicémia.....	55
3.2.10 Medição de frutossamina e insulina	56
3.2.11 Análise Estatística	57
3.3. RESULTADOS.....	58
3.3.1. Anamnese e exame físico	58
3.3.2. Hemograma e análises bioquímicas	58
3.3.3. Exame radiográfico.....	58
3.3.4. Estadiamento clínico do tumor	58
3.3.4.1 Dimensão do tumor.....	59
3.3.5. Exame histopatológico	59
3.3.6. Medição de glicémia.....	60
3.3.7. Doseamento de frutossamina.....	61
3.3.8 Doseamento de insulina	63
3.4 DISCUSSÃO	63
3.5. CONCLUSÃO	70
3.6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	71
III. BIBLIOGRAFIA.....	73
IV. ANEXOS.....	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do tempo dispendido pela aluna, nas principais áreas, durante o estágio curricular.....	xv
Figura 2. Glicogénese (adaptado de Sackheim & Lehman, 2001).	9
Figura 3. Glicogenólise (adaptado de Berg et al, 2004).	10
Figura 4. Glicólise (adaptado de Sackheim & Lehman, 2001).....	12
Figura 5. Gliconeogénese (adaptado de Sackheim & Lehman, 2001).	13
Figura 6. Representação da pró-insulina (adaptado de Berne & Levy, 1993).	15
Figura 7. Apresentação de tumores mamários antes da intervenção cirúrgica.	55
Figura 8. Peça com massas tumorais extirpada, enviada para análise histopatológica.....	55
Figura 9. Glucómetro “OneTouch® UltraMini®” e tiras utilizados no estudo.....	56
Figura 10. Centrifugadora do Hospital da FMV-UTL, utilizada na elaboração do estudo.....	56
Figura 11. Cortes histológicos de carcinomas mamários de amostras colhidas durante o estudo (original).	59
Figura 12. Metástase de carcinoma mamário num linfonodo (original).	60

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento clínico do tumor mamário maligno em gatos, modificado de Owen 1980.	54
Tabela 2. Correlações de Pearson pesquisadas no estudo.	57
Tabela 3. Idade do grupo amostra (N=10).	58
Tabela 4. Distribuição dos casos quanto à Classificação clínica – TNM (N=10).	58
Tabela 5. Dimensão dos tumores do grupo amostra (N=10).	59
Tabela 6. Níveis de glicémia do grupo amostra (N=10).	60
Tabela 7. Níveis de glicémia em T1 e T2 nos 7 animais considerados (N=7).	61
Tabela 8. Correlação entre a glicémia pós-cirúrgica e a dimensão do tumor.....	61
Tabela 9. Níveis de frutossamina do grupo amostra (N=10).	61
Tabela 10. Níveis de frutossamina do sub-grupo “2ª colheita 10 dias após a cirurgia” (N=7).	62
Tabela 11. Correlação entre os níveis de frutossamina pré-cirúrgico e o grau de malignidade.	62
Tabela 12. Teste t-Student para amostras emparelhadas entre os valores de frutossamina das duas colheitas	62

LISTA DE ABREVIATURAS

% - percentagem
 °C - grau Celcius
 Akt - serina-treonina cinase (*serine/threonine kinase*)
 ADN - ácido desoxirribonucleico
 AMPK - proteína cinase activada por adenosina monofosfato (*AMP-activated protein kinase*)
 ARN - ácido ribonucleico
 ALT - Alanina-amino-transferase
 cAMP - AMP-cíclico
 CCK - colecistocinina (*cholecystokinin*)
 CRP - proteína C-reativa (*C-reactive protein*)
 ELISA - testes de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
 ERK - cinases reguladoras de sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinases*)
 FAS: fosfatase alcalina sérica
 FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
 FrAm - frutossamina
 g – grama
 g/kg - grama por quilograma
 GH - Hormona do Crescimento (*Growth Hormone*)
 GIP - péptido inibidor de gastrina (*gastric inhibitory polypeptide*)
 GLP-I - peptídeo-1 semelhante à glucagina (*glucagon-like peptide-1*)
 Hb - hemoglobina
 IGF-1 – Factor-1 de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like Growth Factor 1*)
 IGF-2 – Factor-2 de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like Growth Factor 2*)
 IGR - Rácio Insulina: Glicose (*Insulin: Glucose Ratio*)
 IL-6 - interleucina-6
 IMC – Índice de Massa Corporal
 IR- receptores de insulina (*insulin receptor*)
 IRS - substratos dos receptores de insulina (*insulin receptor substrate*)
 kDa - kilodalton
 Kg - quilograma
 LPDA - Liga Protectora dos Animais
 MAPK - proteína cinase mitogénica ativada (*mitogen-activated protein kinase*)
 µg - micrograma
 µm/L - micrograma por litro
 µUI/mg - micro unidades internacionais por miligrama
 µUI/mL - micro unidades internacionais por mililitro
 mg - miligrama
 mg/dl - miligrama por decilitro
 mL - mililitro
 mm - milímetro
 PI3K - fosfatidilinositol-3-cinase (*phosphatidylinositol 3-kinase*)
 PPAR - receptores activados da proliferação de peroxissomas (*peroxisome proliferator-activated receptors*)
 RIA - radioimunoensaio (*radioimmunoassay*)
 SNC - Sistema Nervoso Central
 TNF-α - factor de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)
 UTL - Universidade Técnica de Lisboa
 VIP - péptido intestinal vasoactivo (*vasoactive intestinal peptide*)

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

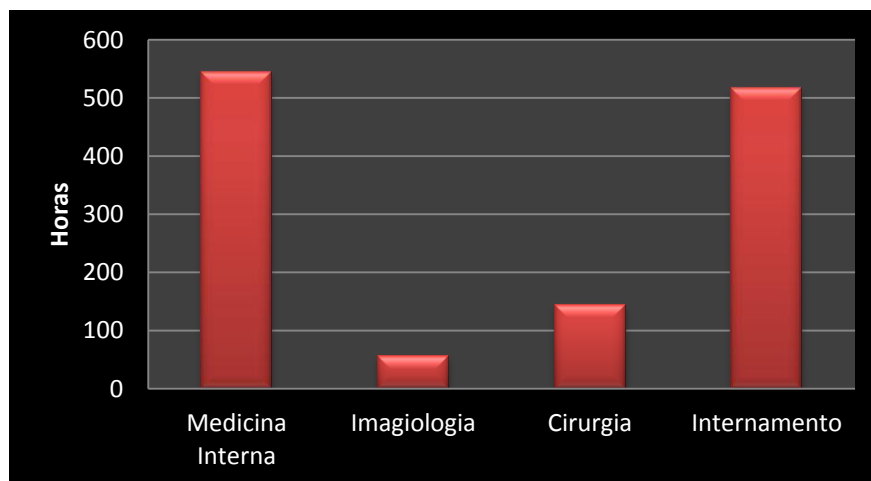
O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária incidiu na área de Clínica de animais de companhia, e decorreu no Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa, com uma duração de seis meses e uma carga horária total de 1260 horas.

Durante este período, a aluna teve a oportunidade de participar nos diversos serviços facultados neste local, realizando escalas, com uma duração mínima de 8 horas, nas áreas de Medicina Interna, de Imagiologia e de Cirurgia, e ficando responsável pelo Internamento, por turnos de 24 horas, ou co-responsável, por turnos de 12 horas, sempre com a supervisão de um médico veterinário (Figura 1).

Devido aos numerosos e variados casos que surgem diariamente neste estabelecimento, foi possível assistir a consultas de diferentes especialidades, tais como, doenças infecciosas e parasitárias, medicina preventiva, dermatologia, gastroenterologia, odontologia e estomatologia, nefro-uropatologia, andrologia, ginecologia e obstetrícia, oncologia, endocrinologia, ortopedia, traumatologia, neurologia, oftalmologia, cardiologia, pneumologia, cuidados intensivos e comportamento animal.

O horário de atendimento geral ao público do Hospital Escolar, durante os dias úteis, era das 9 horas às 21 horas. Ao fim-de-semana, apenas se encontrava em funcionamento o serviço de Internamento, cujas tarefas, determinadas pelo veterinário responsável, são realizadas pelo estagiário destacado. As consultas de especialidade e a realização de determinados exames de diagnóstico ocorrem normalmente uma ou duas vezes por semana, divergindo conforme a área, sendo habitualmente de marcação prévia e realizadas por um corpo clínico específico.

Figura 1. Distribuição do tempo dispendido pela aluna, nas principais áreas, durante o estágio curricular.



1. Actividades realizadas na área da Medicina Interna:

Durante os 6 meses de estágio, 544 horas foram ocupadas na área da Medicina Interna, permitindo a participação em mais de 500 casos clínicos.

Em consulta, a aluna ficava responsável pela elaboração da anamnese e do exame de estado geral, recolhendo toda a informação necessária a dar ao clínico, de modo a poder discutir com ele o plano de diagnóstico e a possível abordagem terapêutica a seguir. Além disso, sempre que surgiam possíveis casos urgentes, tinha o dever de ir de imediato à sala de espera fazer a triagem, através de uma primeira abordagem, em que monitorizava os sinais vitais e recolhia as informações necessárias.

Era também da sua competência o acompanhamento e participação nos exames complementares realizados, tais como, colheita de sangue e urina para análise, radiografia, ecografia, exame neurológico, punção por agulha fina, raspagem de pele, teste da lâmpada de Wood, electrocardiograma, medição da pressão arterial, exame oftalmológico (teste de fluoresceína e teste de Schirmer), entre outros.

Dentro do âmbito da terapêutica e da medicina preventiva, além de outros procedimentos, realizou venopunção, para colocação de cateter e sistema de venoclise, algaliação, administração de fármacos por via oral e por via injectável (subcutânea, intramuscular e intravenosa), imunização, colocação de identificação electrónica, realização de pensos e elaboração de receitas, com a supervisão do médico veterinário e de consulta bibliográfica.

A casuística mais observada incidiu nas áreas da medicina preventiva, com realização de vacinação e desparasitação, nas doenças infecciosas e nas doenças parasitárias (ex: parvovirose, leishmaniose, babesiose e erliquiose), na área de oncologia (ex: carcinoma mamário) e da dermatologia (ex: dermatite atópica). Contudo, nem sempre foi possível dividi-las deste modo, uma vez que a área divergia conforme se abordava as suas causas primárias ou as suas manifestações clínicas.

A aluna teve ainda a oportunidade de assistir a algumas sessões de quimioterapia, desde a preparação do quimioterápico até à sua aplicação, tendo sido responsável pela monitorização do animal aquando do tratamento.

2. Actividades realizadas na área da Imagiologia

A área da Imagiologia foi a menos abordada, tendo compreendido apenas um período de 56 horas totais. Ao longo de semana e meia, a aluna contactou com as práticas efectuadas nos serviços de radiologia, ecografia (obstétrica, abdominal e cardiográfica), mielografia, tomografia axial computadorizada e endoscopia (gastroenteroscopia, pulmonar e uretral). Conforme as áreas, pôde participar no posicionamento e contenção dos pacientes, na indução e controlo da anestesia, ou até na realização e interpretação de exames. Sendo

que, em radiologia, os profissionais responsáveis possibilitaram a observação de várias imagens pré-existentes para a sua análise e discussão, o que enriqueceu a aprendizagem.

3. Actividades realizada na área da Cirurgia

O programa de estágio elaborado incluiu um mês no bloco operatório, do qual resultaram, no mínimo, 144 horas de trabalho e o acompanhamento de mais de 40 procedimentos cirúrgicos. Nesta área, era dever da aluna seguir os pacientes desde a sua entrada no Hospital até ao seu internamento pós-cirúrgico, o que resultou numa grande flexibilidade de horários, conforme as cirurgias marcadas e o aparecimento, ou não, de casos urgentes.

Numa primeira fase, era da sua competência a avaliação pré-cirúrgica, a administração de pré-medicação e a indução anestésica, a preparação do paciente, através de colocação de cateter, intubação endotraqueal, tricotomia, desinfecção e limpeza da zona sujeita à incisão, e ainda, a preparação do material cirúrgico e dos aparelhos de monitorização anestésica. Durante as cirurgias, foram desempenhadas as funções de anestesista, circulante e ajudante de cirurgião, papel no qual teve oportunidade de intrevir na realização de alguns actos cirúrgicos. As operações mais vezes observadas foram orquiectomias e ovariectomias electivas. Contudo, a aluna teve a possibilidade de contactar com vários outros procedimentos, tais como, cistotomia, caudectomia, herniorrafia perineal, gastropexia, trocleoplastia para resolução de luxação medial da patela, entre outros. Por fim, tinha ainda como funções, o encaminhamento do animal para o internamento, a monitorização da sua recuperação, a sua estabilização e a administração de medicação pós-cirúrgica, sempre com a supervisão de um médico veterinário, para além da posterior substituição de pensos e remoção de pontos de suturas.

4. Actividades realizadas no Internamento

Como estagiária responsável pelo Internamento a aluna cumpriu, sozinha ou em parceria com outro estagiário, 516 horas, divididas em 5 turnos de 12 horas e 19 turnos de 24 horas. Durante estes períodos, contava sempre com a orientação de um médico veterinário, e, durante a época lectiva, com a ajuda de alunos de 3º, 4º e 5º ano da faculdade.

No internamento, a aluna tinha a seu cargo o acompanhamento dos doentes encaminhados pela Medicina Interna, os pacientes pré e pós-cirúrgicos, e ainda, a execução de protocolos específicos em animais provenientes de consultas de especialidade, tais como, a elaboração de curvas de glicémia.

Aos internados eram prestados cuidados de higiene, alimentação e bem-estar e efectuadas monitorizações periódicas dos sinais vitais (cor das mucosas, tempo de repleção capilar, pulso femoral, frequências cardíaca e respiratória, e temperatura corporal), de modo a

controlar a sua evolução clínica. Da sua competência era ainda a administração de medicamentos, consoante os tratamentos estipulados e conforme o estado geral do animal, a realização de procedimentos semelhantes aos efectuados em consulta, a prestação de cuidados intensivos e o auxílio na realização das altas.

5. Aulas de especialidade

Como aluna estagiária do hospital da faculdade, teve ainda a possibilidade de assistir a aulas de dermatologia, neurologia e interpretação de electrocardiograma, dadas por clínicos com especial interesse na área.

I. INTRODUÇÃO

Segundo os dados actualmente disponíveis, considera-se que a glicose e outros factores do metabolismo glucídico, tais como a insulina e os IGFs, favorecem o desenvolvimento de tumores mamários (Muti et al., 2002). Adicionalmente, alguns estudos propõem ainda que, a presença de uma hiperglicémia ou de uma hiperinsulinémia se reflecte num pior prognóstico da doença (DeCensi & Genari, 2010). As evidências epidemiológicas, consideradas nesta associação, resultam de pesquisas realizadas tanto em doentes diabéticos como em não diabéticos. A relação proposta, entre o aumento de diferentes parâmetros glucídicos e o risco acrescido de tumores mamários, pode manifestar-se mesmo em animais normoglicémicos e normoinsulinémicos (não diabéticos) (Grote, Becker & Kaaks, 2010).

Muito embora esta hipótese tenha vindo a ser estudada principalmente nas últimas décadas, já havia sido observado, há dois séculos atrás (1885), a existência de níveis anormalmente elevados de glicémia em doentes oncológicos. Do mesmo modo, também já em 1972, foi possível demonstrar a influência da insulina no desenvolvimento tumoral (Heuson & Legros, 1972).

A percentagem elevada de neoplasias mamárias em gatos domésticos, a frequência significativa com que estes animais revelam alterações no seu metabolismo glucídico e a quase inexistência de estudos sobre essa correlação nesta espécie, suportam o interesse do tema.

Contudo, para uma melhor compreensão desta possível associação, apresenta-se necessária uma prévia análise mais profunda e detalhada das principais vias metabólicas glucídicas, da regulação hormonal envolvida e dos principais métodos laboratoriais usados para a sua interpretação.

II. Estudo das variações no metabolismo glucídico em gatos domésticos com neoplasia mamária

1. METABOLISMO GLUCÍDICO

1.1 HOMEOSTASE GLÚCIDICA

A digestão dos carboidratos presentes na dieta apresenta como produtos finais a glicose, a frutose e a sacarose, as quais são transportadas pela veia porta até ao fígado (Bender & Mayes, 2006a). Ao nível deste órgão, tanto a frutose como a galactose são convertidas em glicose, sendo esta o monossacarídeo mais importante presente no fluxo sanguíneo (Sackheim & Lehman, 2001).

A glicose tem uma particular importância em relação a outras fontes energéticas relevantes no organismo porque, sob a maioria das condições, é a única consumida pelo sistema nervoso central (SNC). Para um normal funcionamento do metabolismo cerebral é necessário que haja um suprimento constante de glicose a este nível (Wolf et al., 2006). É por isso que, em períodos de jejum, os alvos principais deste monossacarídeo são os eritrócitos e as células do SNC, totalmente dependentes da glicose (Bender & Mayes, 2006c). Deste modo, torna-se clara a necessidade de um elaborado sistema de homeostase que regule a glicémia e a sua disponibilidade para o cérebro e outros tecidos (Wolf et al., 2006).

Esta homeostasia resulta da interacção de diversos factores, tais como: a ingestão de carboidratos na dieta, o armazenamento e libertação de glicose pelo fígado, a sua utilização em tecidos extra-hepáticos, a acção das principais hormonas reguladoras da glicémia (insulina e glucagina), e o efeito de várias outras hormonas na resposta celular à insulina e na libertação hepática de glicose (Bender & Mayes, 2006d ; Knottenbeld, 2005).

De uma forma global, o metabolismo glucídico anormal pode dever-se a uma nutrição escassa, a uma deficiência enzimática, a uma alteração na secreção hormonal ou a uma acção farmacológica ou toxicológica (Bender & Mayes, 2006d).

1.2 GLICOGÉNIO

Em todos os organismos, de um modo geral, o excesso de glicose é convertido numa forma polimérica de armazenamento, o glicogénio (Nelson & Cox, 2008).

O glicogénio é um polímero de glicose altamente ramificado presente primariamente no fígado, onde representa aproximadamente 10% do seu peso, e no músculo esquelético, compondo 1 a 2% do seu peso (Greco & Stabenfeldt, 2004; Nelson & Cox, 2008). Contudo, apesar destes valores percentuais, como a massa muscular corporal é muito superior à massa hepática, considera-se que cerca de $\frac{3}{4}$ do glicogénio presente no organismo se encontra nos músculos (Bender & Mayes, 2006c).

O seu armazenamento tem lugar em grandes grânulos, com um diâmetro que varia entre os 10 e os 40 nm, presente no citosol das células. A β -partícula, partícula elementar do glicogénio, tem 21 nm de diâmetro e é composta por mais de 55000 resíduos de glicose, com cerca de 2000 terminais não redutores (Berg, Tymoczko & Stryer, 2004; Nelson & Cox, 2008). A maior parte dos monossacarídeos de glicose aqui presentes estão unidos por ligações glicosídicas α -1,4, enquanto que as ramificações criadas, que têm lugar em uma em cada dez oses, resultam de ligações glicosídicas α -1,6 (Berg et al, 2004).

A mobilização de glicose para os depósitos de glicogénio e a sua formação a partir deles é considerada o principal meio de regulação da homeostase glucídica. Isto porque, embora a glicose presente no organismo possa ser sintetizada a partir de outros compostos, o glicogénio é considerado a sua única forma de armazenamento directo. Simplificando, o glicogénio tem uma função tampão, sendo responsável pela manutenção dos níveis de glicémia no organismo.

Para além disso, a glicose, conservada deste modo, pode ser rapidamente mobilizada, tornando-se uma efectiva fonte de energia em momentos de uma grande e repentina actividade (Greco & Stabenfeldt, 2004).

Neste ponto, torna-se necessário clarificar a diferença entre o glicogénio hepático e glicogénio muscular os quais, embora tenham mecanismos gerais de armazenamento e mobilização iguais, apresentam subtis mas importantes diferenças enzimáticas, as quais são responsáveis pelas suas divergentes funções (Nelson & Cox, 2008).

De uma forma geral, enquanto no músculo estes mecanismos são regulados de modo a suprir as necessidades do próprio órgão, no fígado a sua função é manter valores glicémicos adequados às necessidades gerais de todo o organismo (Berg et al, 2004). O glicogénio muscular providencia uma fonte rápida e eficaz de energia que tanto pode ser usada no metabolismo aeróbio como anaeróbico. A exaustão desta forma de armazenamento pode ocorrer em menos de uma hora, aquando de uma actividade física intensa. O glicogénio hepático é considerado o principal reservatório de glicose, a qual é fornecida aos outros tecidos nos intervalos entre as refeições, durante períodos de jejum. Se não houver reposição, após 12 a 24 horas a sua depleção pode ser completa (Nelson & Cox, 2008).

Contudo, apesar do glicogénio presente no tecido muscular não poder ser convertido directamente em glicose, pois não existe neste local a enzima necessária à sua conversão (glicose-6-fosfatase), o piruvato, produto resultante da glicólise que ocorre a este nível, pode ser transformado, exportado, e utilizado na gliconeogénese hepática (Bender & Mayes, 2006c).

Quando a quantidade de glicose presente no sangue excede a sua capacidade de armazenamento como glicogénio, observa-se, como mecanismo alternativo de remoção, a síntese de triglicerídeos (Greco & Stabenfeldt, 2004). Porém, a energia conservada sob a

forma de glicogénio é de vital importância porque, embora exista em muito menor quantidade do que em forma de triglicerídeos, estes últimos não podem ser catabolizados por via anaeróbica, nos mamíferos (Nelson & Cox, 2008).

1.3 PRINCÍPIOS GERAIS DO METABOLISMO GLUCÍDICO

1.3.1 Principais fontes e destinos

Os valores de glicémia, presentes no organismo em determinado momento, resultam da quantidade de carboidratos anteriormente digeridos e do balanço das diversas vias metabólicas envolvidas na regulação glucídica. Para uma fácil compreensão, podemos considerar que a glicose presente no sangue pode ter diferentes origens e apresentar vários destinos alternativos, agrupados do seguinte modo (Aronoff, Berkowitz, Shreiner & Want, 2004; Sackheim & Lehman, 2001):

A) Fontes principais

- Absorção intestinal – fruto da ingestão de uma dieta composta por carboidratos, sendo determinante para a velocidade de entrada em circulação a taxa de esvaziamento gástrico.
- Glicogenólise – processo responsável pela decomposição do glicogénio armazenado em glicose livre.
- Gliconeogénese – conjunto de processos metabólicos que promovem a formação de glicose a partir de substratos não glucídicos, como o lactato e determinados aminoácidos, após longos períodos de jejum. Esta via tem lugar principalmente no fígado, ocorrendo também, de forma mais limitada, no rim (Aronoff et al., 2004; Greco & Stabenfeldt, 2004).

B) Destinos possíveis

- Glicólise (ou Via Embden – Meyerhof) – sequência de etapas bioquímicas que providenciam a oxidação da glicose em piruvato e lactato, considerado genericamente um processo reversível.
- Via pentoses-fosfato – caminho oxidativo alternativo para a glicose. Via quantitativamente menor e de fraco impacto na homeostase glucídica, mas de grande importância para os eritrócitos.
- Glicogénese – síntese de glicogénio a partir de glicose que, como já anteriormente explicado, ocorre principalmente no fígado e nos músculos.
- Excreção pelos rins – não ocorre normalmente, manifestando-se apenas quando o limiar de excreção renal é ultrapassado, e traduz-se em glicosúria (Greco & Stabenfeldt, 2004; Sackheim & Lehman, 2001).

1.3.2 Transportadores de glicose

O passo inicial no metabolismo da glicose é o seu transporte através da membrana celular por um processo de difusão facilitada. Este mecanismo é modelado por uma família de pelo menos catorze pequenas proteínas membranares, denominadas de transportadores de glicose (GLUT-1 a GLUT-14) (Rijnberk & Kooistra, 2010). Cada uma delas tem, aproximadamente, 450 aminoácidos e um peso molecular de 40-50 Kilodalton (kDa), e encontram-se heterogeneamente distribuídos por diversos tecidos, onde apresentam comportamentos diferentes. A localização dos 4 primeiros transportadores (GLUT-1 a GLUT-4) é já bem conhecida:

O GLUT-1 encontra-se ao nível do cérebro, eritrócitos, placenta e rins, e é responsável pela absorção da pequena quantidade de glicose basal necessária para manter os processos de produção de energia nas células. A sua actividade aumenta em períodos de jejum e diminui quando há sobrecarga de glicose.

O GLUT-2 expressa-se nos hepatócitos, onde há transferência de glicose para fora das células, e nas células pancreáticas produtoras de insulina, onde mantém o equilíbrio entre a concentração no citoplasma e no líquido extracelular.

As proteínas GLUT-3 localizam-se no cérebro, enquanto as GLUT-4 encontram-se exclusivamente no músculo cardíaco e esquelético, e no fígado (Berne & Levy, 1993; Kaneko, 1997).

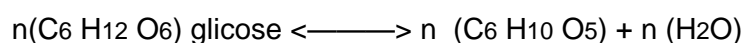
1.3.3 Principais vias metabólicas

O metabolismo glúcido global apresenta centenas de reacções. No entanto, a quantidade de reacções diferentes existentes é pequena, com efeito as vias metabólicas são baseadas na soma de processos relativamente simples e comuns, mas de regulação enzimática complexa (Sackheim & Lehman, 2001). As enzimas intervenientes neste processo respondem alostericamente aos metabolitos que sinalizam as necessidades energéticas das células, de modo a ajustar constantemente a sua actividade (Berg et al, 2004).

A exposição, sucinta e resumida, das principais vias metabólicas envolvidas é apresentada seguidamente.

1.3.3.1 Glicogénese

A conversão de glicose em glicogénio, e vice-versa, pode ser expressa segundo a fórmula global:



No entanto, esta reacção expressa apenas o resultado final de uma sequência de etapas, cada uma delas catalisada por uma enzima específica e que a seguir se descreminam:

1ª etapa: Conversão de glicose em glicose-6-fosfato, por acção da enzima glicocinase (Sackheim & Lehman, 2001).

2ª etapa: Transformação de glicose 6-fosfato no isómero glicose-1P, através da enzima fosfoglicomutase.

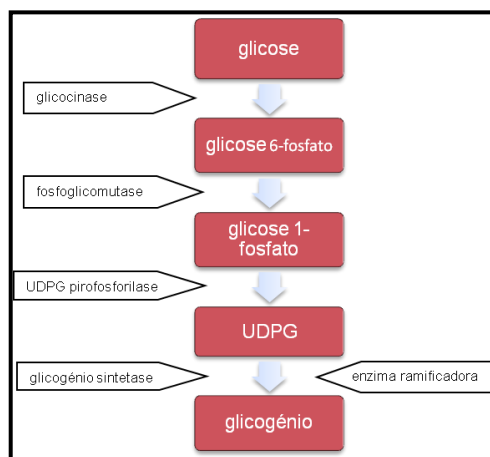
3ª etapa: Reacção de glicose 1-fosfato com uridina trifosfato (UTP) para formar o nucleótido activo uridina difosfato glicose (UDPG), catalisada pela UDPG pirofosforilase (Bender & Mayes, 2006c).

Por fim, as moléculas de glicose ativadas (UDPG) unem-se para formar glicogénio, resultante da acção da enzima glicogénio sintetase e da enzima ramificadora (Figura 2). A primeira é regulada pela insulina e pelo AMP-cíclico (cAMP) (Sackheim & Lehman, 2001).

Contudo, a glicogénio sintetase só pode adicionar UDPG se a cadeia polissacarídea contiver mais de 4 oses. Por isso, é imperativa a existência de um primer para a ocorrência da glicogénese. Esta função está a cargo da proteína composta Glicogenina.

As ramificações formadas aumentam a solubilidade do glicogénio e o número de radicais terminais, locais de acção do glicogénio fosfatase e glicogénio sintetase, sendo responsável por uma maior velocidade de síntese e degradação (Berg et al, 2004).

Figura 2. Glicogénese (adaptado de Sackheim & Lehman, 2001).



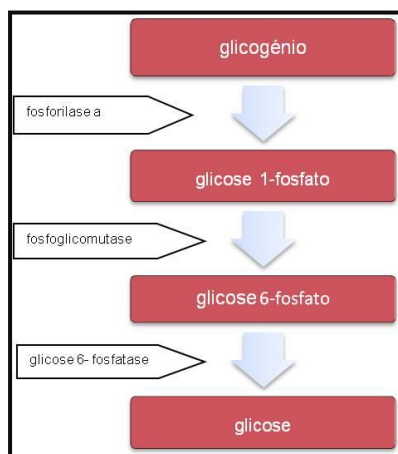
1.3.3.2 Glicogenólise

Ao contrário do que seria espectável, a glicogenólise não é o processo reverso da glicogénese, ocorrendo por uma via separada (Bender & Mayes, 2006c).

Descrevendo as suas fases de uma forma sumária, a catabolização do glicogénio é iniciada pela acção da enzima glicogénio fosforilase, que cliva o substrato pela adição de ortofosfato (Pi). O produto resultante, a glicose-1-fosfato, é prontamente transformada em glicose-6-fosfato, pela enzima fosfoglicomutase (Berg et al, 2004). Finalmente, a glicose-6-fosfato é

convertida em glicose pela glicose-6-fosfatase, a qual é uma enzima que está presente no fígado mas não nos músculos nem no tecido adiposo (Sackheim & Lehman, 2001) (Figura 3).

Figura 3. Glicogenólise (adaptado de Berg et al, 2004).



A glicogénio fosforilase, a enzima principal de catabolização do glicogénio, actua ininterruptamente, ao nível dos terminais não redutores das ligações, até atingir os pontos de ramificação, onde suspende a sua função. A sua actividade cessa a 4 resíduos de glicose do local de ramificação. Para que esta possa continuar a actuar é necessária a intervenção de uma enzima desramificadora com dupla função, que catalise duas reacções sucessivas. A enzima desramificadora apresenta uma acção como transferase, responsável pela transferência de um bloco de três moléculas de glicoses de um ramo externo para outro, e uma acção como glicosidase, que hidrolisa a ligação glicosídica α -1,6 do resíduo glicosídico resultante (Nelson & Cox, 2008).

1.3.3.3 Regulação do metabolismo do glicogénio

A glicogénese e a glicogenólise são reguladas, de modo recíproco e integrado, por uma cascata accionada pelo AMP-cíclico (cAMP), que age através da proteína cinase A (Berg et al, 2004).

A cAMP é formada a partir do ATP, na face interna da membrana celular, por activação da enzima adenilciclase, actuando como 2º mensageiro intracelular responsivo a diferentes hormonas, ampliando os efeitos destas. O aumento na concentração de cAMP no citosol activa a proteína cinase A, a qual promove a fosforilação da fosforilase cinase, o que resulta na activação da fosforilase (fosforilase **a**, activa) e na inactivação da glicogénio sintase. Este processo é influenciado positivamente pela glucagina, no fígado, e pela adrenalina, principalmente no músculo, e resulta na catabolização do glicogénio (Bender & Mayes, 2006c).

As alterações produzidas, por proteína cinases, na actividade enzimática são revertidas por proteínas fosfatases. Reciprocamente, a inactivação da proteína fosfatase 1 (PP1) ocorre quando há activação da cascata do cAMP e consequentemente da proteína cinase A.

A PP1 tem um importante papel no metabolismo do glicogénio, inactivando a fosforilase cinase e consequentemente a fosforilase **a**, e activando a glicogénio sintase. Esta é estimulada pela insulina e aumenta a síntese de glicogénio.

Contudo, embora a insulina seja o sinal primário para a glicogénese, existem outros mecanismos com a mesma função, como por exemplo o valor da glicémia. Com a entrada de glicose no fígado a quantidade de fosforilase **a** diminui, considerando-se esta enzima o sensor de glicose hepático (Berg et al, 2004).

1.3.3.4 Glicólise

A glicólise, a maior via metabólica da glicose, é um processo anaeróbico, ocorre em todas as células do organismo a nível do citosol, e apresenta o piruvato como produto final. Em condições de anaerobiose o piruvato transforma-se em lactato, enquanto que, na presença de oxigénio, o piruvato e o lactato são convertidos em água e dióxido de carbono pelo ciclo de Krebs.

A equação final da glicólise pode ser resumida como (Bender & Mayes, 2006b; Sackheim & Lehman, 2001):



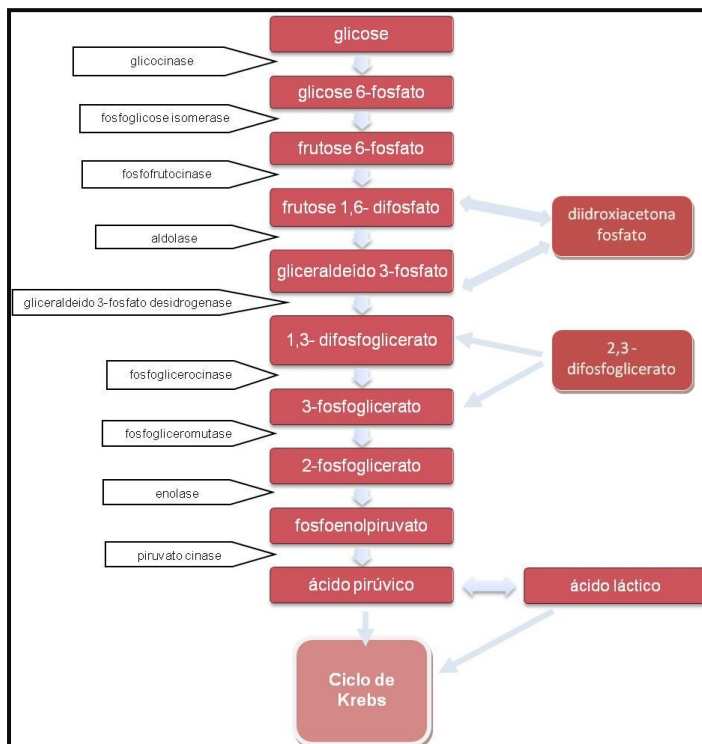
A glicose-6-P, necessária para que se inicie a reacção, é produto da glicogenólise ou resulta da formação directa a partir da glicose, pela acção do ATP e da enzima glicocinase. Todas as etapas envolvidas na glicólise encontram-se esquematicamente representadas na Figura 4.

As enzimas mais importantes na regulação do catabolismo de glicose são a hexocinase, a frutose-6-P cinase e a piruvato cinase, responsáveis pelas três reacções irreversíveis do processo. A enzima fosfofrutocinase apresenta um importante papel no controlo da taxa de glicólise, sendo inibida por altos níveis de ATP e estimulada por baixos níveis de ATP (Sackheim & Lehman, 2001).

A capacidade de produzir ATP a partir de glicose, em situações de anaerobiose, é de grande importância porque suporta a alta performance muscular em períodos de hipóxia e possibilita a sobrevivência dos tecidos durante períodos de anóxia (Berg et al, 2004). O cérebro, o tracto gastrointestinal, a medula renal, a retina e a pele são outros dos tecidos que obtêm muito da sua energia através desta via metabólica, sendo produtores de lactato (Bender & Mayes, 2006b).

Do lactato produzido a este nível, 4/5 são convertidos em glicogénio, pelo processo inverso à glicólise, sendo uma porção transformado em glicogénio muscular e outra enviada para o fígado. O lactato é considerado o final desta cadeia metabólica (Sackheim & Lehman, 2001).

Figura 4. Glicólise (adaptado de Sackheim & Lehman, 2001).



1.3.3.5 Gliconeogénese

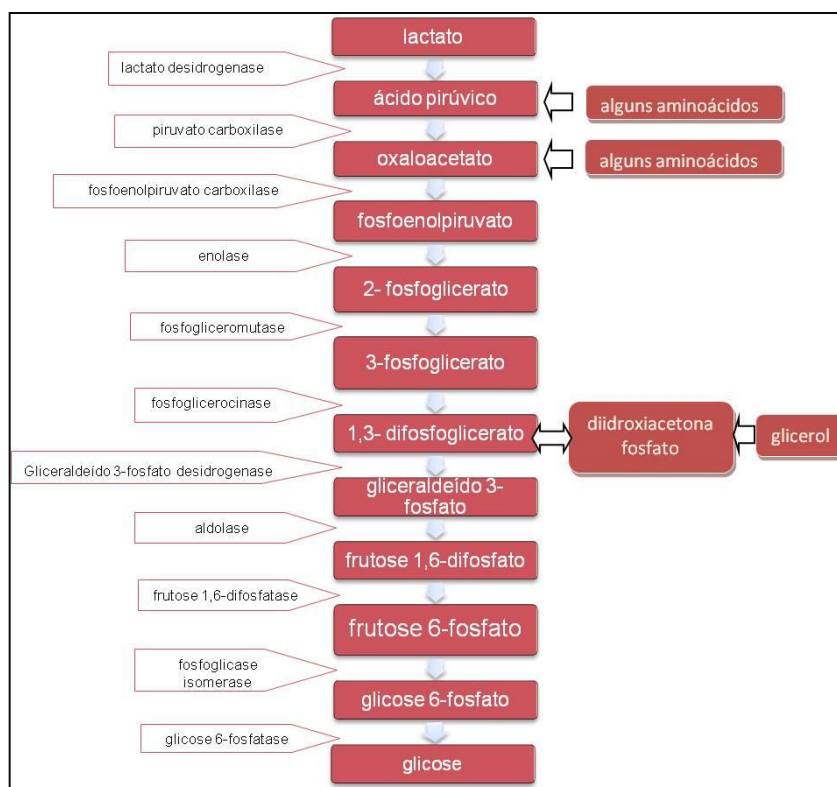
Os depósitos hepáticos são relativamente limitados, suprimindo as necessidades glicémicas durante apenas 6 a 12 horas em condições normais, ou durante 20 minutos aquando de actividade intensa. Torna-se, por isso, clara a necessidade de outra via metabólica que seja capaz de manter o valor de glicose no organismo durante períodos de esforço ou de jejum prolongado (Greco & Stabenfeldt, 2004).

Esta via, a gliconeogénese, é responsável pela produção de glicose a partir de precursores que não os carboidratos, como os aminoácidos glicogénicos, o lactato, o glicerol e o propionato (Bender & Mayes, 2006a). A sua activação é promovida pela enzima frutose-4,6-bifosfatase, estimulada por fosforilação e responsável pela reversão da via glicolítica (Greco & Stabenfeldt, 2004). Contudo, apesar do resultado final da gliconeogénese ser o reverso da glicólise, existem três reacções irreversíveis na glicólise que impedem a reversão simples destas duas vias metabólicas (Greco & Stabenfeldt, 2004) e (Bender & Mayes, 2006a).

A descrição geral das diferentes etapas envolvidas na gliconeogénese encontra-se esquematizada na Figura 5.

Esta via é estimulada por dietas ricas em proteína e inibida por dietas ricas em carboidratos. Em estados de inanição, a glicose pode ser produzida a partir de aminoácidos dos tecidos proteicos do próprio organismo. Exemplificativamente, nos casos graves de diabetes mellitus, a gliconeogénese adquire os seus substratos a partir dos alimentos mas também dos tecidos proteicos, o que pode levar a um estado de emaciação e posterior exaustão (Sackheim & Lehman, 2001).

Figura 5. Gliconeogénese (adaptado de Sackheim & Lehman, 2001).



1.3.3.6 Regulação recíproca da glicólise e da gliconeogénese

A glicólise e a gliconeogénese possuem várias etapas comuns, ocorrendo apenas em direcções opostas, do que resulta uma regulação recíproca e reforçada de ambas as vias. Ou seja, quando existe um aumento da glicose no organismo as enzimas responsáveis pela sua utilização tornam-se mais activas e as enzimas responsáveis pela sua produção reduzem a sua actividade.

A insulina, libertada nos períodos de hiperglicémia, contribui para a síntese de enzimas-chave da glicólise e antagoniza os efeitos dos glicocorticóides e da glucagina. A glucagina e a adrenalina, libertadas em resposta à hipoglicémia, inibem a glicólise e estimulam a gliconeogénese, aumentando a concentração de cAMP nas células (Bender & Mayes, 2006c).

1.4 HORMONAS GLUCORREGULADORAS

Como referido anteriormente, a homeostase glucídica resulta não só de uma auto-regulação mas também da acção e influência de diversas hormonas. Para que a sua participação na regulação se manifeste é necessária a existência de um sistema de transporte e de receptores nas células-alvo (Scott & Stockham, 2002).

A insulina e a glucagina são consideradas as principais hormonas glucorreguladoras, actuando conjuntamente mas com funções opostas na manutenção de valores estáveis de glicose no sangue. Embora estas duas hormonas pancreáticas sejam essenciais no metabolismo glucídico, é importante identificar várias outras que apresentam também algum tipo de influência a este nível (Martin & Crump, 2003). Entre estas destacam-se a amilina e a somatostatina, produzidas igualmente no pâncreas, a hormona de crescimento (growth hormone, GH), as catecolaminas, como a adrenalina e a noradrenalina, os glicocorticóides, como o cortisol, algumas hormonas gastrointestinais (Kaneko, 1997) (Aronoff et al., 2004), as hormonas da tiróide (Sackheim & Lehman, 2001), a progesterona, o estrogénio (Knottenbeld, 2005), e algumas citocinas (Bender & Mayes, 2006a).

O presente conhecimento do papel de todas elas permite-nos ter uma visão multi-hormonal da homeostase glicémica (Aronoff et al., 2004).

1.4.1 Principais hormonas

A insulina, descoberta nos anos 20 do século XX, foi considerada à época como a hormona responsável pela regulação da entrada e saída de glicose em circulação. Consequentemente, durante décadas, a diabetes foi considerada uma desregulação mono-hormonal, causada unicamente pela deficiência em insulina.

Posteriormente, nos anos 50, a glucagina é identificada como o maior estimulador da libertação de glicose no fígado. Perante esta descoberta, foi criado um modelo simplista bi-hormonal que permitiu um melhor entendimento da interacção entre a insulina e a glucagina (Aronoff et al., 2004).

Genericamente, a insulina reduz a glicémia, facilitando a entrada de glicose nas células para posterior glicólise ou glicogénese, enquanto a glucagina, contrariamente, aumenta este parâmetro estimulando a glicogenólise e a gliconeogénese hepática (Martin & Crump, 2003).

1.4.1.1 Insulina

A possível substância com acções anti-diabéticas, secretada a nível pancreático, foi denominada “insulina” em 1909, por Meyer. Porém, a prova definitiva da sua existência só

viria a surgir em 1921, quando Frederick Banting e Charles Best a conseguiram extrair de um pâncreas canino (Goodman, 1980).

Actualmente, sabe-se que esta hormona é produzida nas células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas endócrino, e é claro o seu envolvimento na homeostase glicémica (Greco & Stabenfeldt, 2004).

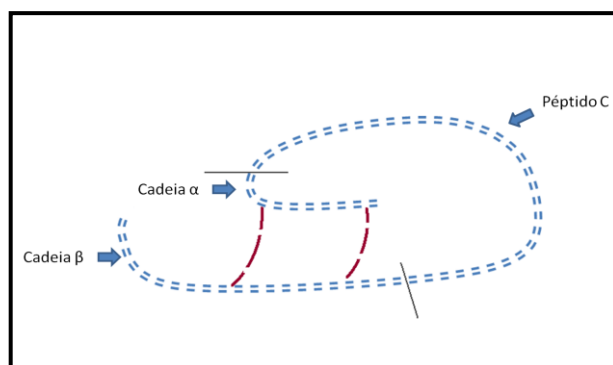
1.4.1.1.1 Estrutura

A insulina é um polipéptido, com peso molecular de 6000 kDa, composta por duas cadeias de aminoácidos, α (21 aminoácidos) e β (30 aminoácidos), ligadas por duas pontes dissulfeto. Existem pequenas diferenças na composição dos aminoácidos entre espécies, encontrando-se estas variações principalmente ao nível da posição 8, 9 e 10 da cadeia α . Consequentemente, embora as acções biológicas da insulina não sejam altamente espécie-específicas, pode ocorrer produção de anticorpos após a administração de insulina heterogénea (Martin & Crump, 2003).

1.4.1.1.2 Síntese

A sua síntese, semelhante à de outras hormonas peptídicas, começa com a translação do ARN de insulina pelos ribossomas presentes no retículo endoplasmático rugoso, e com a consequente formação do polipeptídeo linear pré-pro-insulina. No mesmo local, o fragmento N-terminal deste polipeptídeo é removido, e formam-se duas pontes dissulfeto entre as cadeias α e β desta molécula. O seu produto, a pró-insulina, é transferido para o aparelho de Golgi, onde é processado e armazenado em grânulos. Estes grânulos contêm a insulina e o peptídeo conectante ou péptido C (Figura 6), resultantes da clivagem da pró-insulina, que são posteriormente libertados pelas células β numa proporção de um para um (Guyton & Hall, 2000). Por isso, a detecção de péptido C no sangue traduz uma produção, no mínimo residual, de insulina pelas células β pancreáticas (Knottenbeld, 2005). Contudo, a concentração de péptido C circulante é superior à de insulina porque demora o dobro do tempo a ser eliminado. Este é catabolizado pelo rim e parcialmente excretado na urina (Kaneko, 1997).

Figura 6. Representação da pró-insulina (adaptado de Berne & Levy, 1993).



1.4.1.1.3 Secreção de insulina e do péptido C

Da fusão da membrana dos grânulos de armazenamento com a membrana plasmática das células resulta a secreção de insulina e do péptido C, por exocitose. Estes são então libertados para os capilares e entram no sistema porta.

Actualmente, ainda não se sabe ao certo se o peptídeo conectante tem alguma actividade biológica (Martin & Crump, 2003).

1.4.1.1.4 Regulação da secreção de insulina

1.4.1.1.4.1 - Carbohidratos

Os factores que influenciam a secreção de insulina são muitos, contudo, a concentração de glicose no sangue é certamente o regulador mais importante.

A quantidade de insulina libertada durante a ingestão de carbohidratos e nas horas seguintes é muito elevada, devido há abundância de substratos energéticos presentes em circulação (Martin & Crump, 2003). Tal facto resulta de características únicas das células β , que são livremente permeáveis à glicose, a qual entra através de transportadores GLUT-2. Deste modo, em estados de hiperglicémia, há um aumento directo do seu metabolismo nas células pela via da glicólise e do ciclo de Krebs, o que resulta na produção de ATPs. O aumento de ATPs provoca a inibição dos canais de potássio sensíveis ao ATP, com consequente despolarização da membrana celular. Devido a isso, os canais de cálcio sensíveis à voltagem abrem, o cálcio entra nas células, elevando a sua concentração, e a exocitose de insulina manifesta-se (Bender & Mayes, 2006a).

1.4.1.1.4.2 - Aminoácidos

Alguns aminoácidos também são considerados estimulantes da secreção de insulina, em particular a arginina, a lisina e a leucina, que são capazes de promover essa função, em humanos, mesmo na ausência de glicose. Contudo, em relação aos animais domésticos, apenas a arginina apresenta esta capacidade, estando a acção das outras duas ainda por determinar. Alguns metabolitos dos aminoácidos são também capazes de estimular a secreção de insulina (Martin & Crump, 2003).

Torna-se necessário no entanto esclarecer que, a sua administração, na ausência de elevadas concentrações de glicose, provoca apenas um pequeno aumento na libertação desta hormona. Este fenómeno previne estados de hipoglicémia após uma refeição proteica pobre em carbohidratos. Assim, considera-se que a principal acção destes aminoácidos a este nível é potenciar fortemente o estímulo da glicose (Goodman, 1980; Guyton & Hall, 2000).

1.4.1.1.4.3 - Ácidos gordos/ triglicéridos

Os ácidos gordos de cadeia curta e longa são importantes secretagogos de insulina em diferentes animais, como o cão e o gato (Martin & Crump, 2003). O estímulo de secreção pode ser directo ou potenciado por incretinas (Rijnberk & Kooistra, 2010).

1.4.1.1.4.4 - Hormonas gastrointestinais

Na década de sessenta, Perley e Kipnis, entre outros, provaram que a administração de glicose *per os* provocava uma maior secreção de insulina do que a sua administração endovenosa (Aronoff et al., 2004). Esta reacção sugeria que existia algum tipo de sinal gastrointestinal, responsável por uma resposta antecipatória das células β pancreáticas, que duplicava a taxa de libertação de insulina quando a glicémia aumenta (Guyton & Hall, 2000). Actualmente, considera-se que a acção mista de várias hormonas gastrointestinais, como a gastrina, a secretina, a glicentina, o péptido intestinal vasoactivo (vasoactive intestinal peptide, VIP), a colecistocinina (cholecystokinin, CCK) e, principalmente, o péptido inibidor de gastrina (gastric inhibitory polypeptide, GIP) e o peptídeo-1 semelhante à glucagina (glucagon-like peptide-1, GLP-1), é responsável por um aumento moderado na libertação de insulina (Guyton & Hall, 2000; Bender & Mayes, 2006a).

A primeira hormona gastrointestinal que foi estudada com esta função foi a GIP. Esta apresenta uma acção estimuladora da secreção de insulina aquando da ingestão de gordura ou de glicose mas não inibe a secreção de glucagina nem o esvaziamento gástrico. No entanto, embora a acção de GIP seja a mais potente, a hormona GLP-1 é secretada em maior quantidade. A GLP-1 é estimuladora da libertação de insulina dependente de glicose e apresenta-se em níveis significativamente baixos durante o jejum ou durante o período pós-prandial, em casos de diabetes tipo II ou de intolerância à glicose. Esta hormona, sintetizada e secretada no ílio e no cólon, é capaz ainda de inibir a libertação de glucagina e o esvaziamento gástrico. Estudos realizados em ratos demonstraram que a sua actuação resulta da sua acção directa nos receptores GLP-1 das células pancreáticas ou da sua acção indirecta através dos nervos sensoriais (Aronoff et al., 2004).

1.4.1.1.4.5 - Outras hormonas e o sistema nervoso autónomo

Existem várias hormonas, para além das anteriormente referidas, que são importantes na secreção de insulina, tais como a glucagina, a somatostatina, a hormona de crescimento, o cortisol, a progesterona e os estrogénios (Guyton & Hall, 2000).

A glucagina tem um efeito estimulador sobre as células β , enquanto a somatostatina, pelo contrário, tem um efeito inibitório sobre as mesmas (Greco & Stabenfeldt, 2004).

A hormona de crescimento, os glicocorticóides, o estrogénio e a progesterona aumentam a resistência periférica à insulina, provocando o aumento da secreção pancreática desta última (Meyer, Coles & Rich, 1992).

O sistema nervoso autónomo também tem um papel importante na síntese e secreção das hormonas pancreáticas. Tanto o ramo simpático como o ramo parassimpático apresentam uma ampla distribuição nos ilhéus de Langerhans, capaz de modelar a sua secreção. Esta regulação, por parte do sistema nervoso autónomo, é largamente coordenada pelo hipotálamo. Durante a fase prandial, o sistema parassimpático estimula a libertação de insulina. As catecolaminas, resultantes da estimulação dos nervos simpáticos, inibem a secreção de insulina e estimulam a libertação de glucagina. Os factores de stress, como o exercício, a hipóxia, a hipotermia e a cirurgia, podem provocar a supressão da excreção de insulina pela acção das catecolaminas nos receptores α 2-adrenérgicos (Martin & Crump, 2003).

1.4.1.1.5 Activação dos receptores celulares de insulina

O principal efeito da insulina é aumentar a permeabilidade das membranas celulares à glicose. A sua acção também facilita a entrada de aminoácidos, potássio, fósforo e magnésio, mas por mecanismos diferentes (Martin & Crump, 2003).

Porém, para que a sua acção tenha início, é necessário que a insulina se ligue a receptores proteicos, receptores tirosina cinase, na membrana das células-alvo. Segundos após a ligação da insulina a estes receptores, a membrana torna-se altamente permeável à glicose, particularmente nas células musculares e adiposas (Guyton & Hall, 2000; Martin & Crump, 2003).

O receptor de insulina, uma grande glicoproteína, consiste na combinação de quatro subunidades, duas α e duas β , unidas por ligações dissulfito. As subunidades α encontram-se localizadas inteiramente fora da membrana, enquanto as subunidades β penetram através da membrana. A insulina liga-se às subunidades α , no exterior, o que vai despoletar a autofosforilação dos resíduos de tirosina, nas subunidades β , e a consequente activação da tirosina cinase (Guyton & Hall, 2000).

Após esta activação, os receptores vão provocar a fosforilação de diversas proteínas intracelulares, como os componentes da família dos substratos dos receptores de insulina (insulin receptor substrate, IRS) e a proteína adaptadora Shc. A ligação dos IRS com os receptores de insulina (insulin receptor, IR) resulta na activação de fosfatidilinositol-3-cinase (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), que estimula a via da proteína serina-treonina cinase (serine/threonine kinase, Akt). Por sua vez, a ligação da proteína Shc aos IR promove a activação da cascata cinases reguladoras de sinal extracelular (extracellular signal-regulated kinases, ERK), uma das vias da proteína cinase mitogénica ativada (mitogen-activated protein kinase, MAPK). Assim, apesar de grande parte das acções da insulina ser de cariz metabólico, estas duas vias implicadas apresentam um papel importante na tumorigénese (Wolf & Rubinek, 2008).

Apesar da sua interacção preferencial com a insulina, estes receptores também se podem ligar com os factores de crescimento semelhantes à insulina (insulin-like growth factor, IGF). (Martin & Crump, 2003).

1.4.1.1.6 Inactivação da insulina

A inactivação da insulina através da clivagem das pontes dissulfito pode ocorrer em qualquer célula mas tem lugar, principalmente, a nível hepático, sendo o fígado capaz de inactivar cerca de 50% da insulina total (Kaneko, 1997).

1.4.1.1.7 Principais funções metabólicas da insulina

A insulina representa diversos papéis no organismo, actuando no metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas. Um dos locais alvo da sua acção com maior relevância é o fígado, em parte porque o fluxo venoso pancreático vai directamente para este órgão.

Genericamente, esta hormona promove a diminuição das concentrações sanguíneas de glicose, ácidos gordos e aminoácidos, e a conversão intracelular destes em glicogénio, triglicéridos e proteínas (Greco & Stabenfeldt, 2004).

1.4.1.1.7.1 - Efeitos no fígado

Um dos efeitos mais importantes a nível hepático é a estimulação da glicogénese, através da activação das enzimas-chave (glucocinase e glicogénio sintase) com consequente produção de glicogénio. Em simultâneo, a síntese inibe as enzimas responsáveis pela glicogenólise (glicose-6-fosfatase e fosforilase). A este nível, apenas uma pequena parte de glicose em excesso sofre um processo de glicólise.

Esta hormona é também responsável pela redução da absorção hepática de aminoácidos e pela inibição das enzimas gliconeogénicas (piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxicinase) (Martin & Crump, 2003).

Quando a quantidade de glicose absorvida no fígado é superior à capacidade de armazenamento como glicogénio ou de utilização no metabolismo dos hepatócitos, a insulina promove a sua conversão em ácidos gordos. Estes são transportados pelo sangue em lipoproteínas, sob a forma de triglicéridos, até ao tecido adiposo, onde formam depósitos de gordura (Guyton & Hall, 2000).

1.4.1.1.7.2 - Efeitos no músculo

Em termos quantitativos, o maior alvo da insulina é o tecido muscular, onde esta estimula a absorção de grandes quantidades de glicose e, em menor quantidade, de aminoácidos. Quando a concentração sanguínea de aminoácidos aumenta, os miócitos tornam-se o principal local de sequestro e armazenamento. O papel desta hormona é estimular o

transporte activo dos aminoácidos para as células, promover a síntese proteica e inibir a proteólise (Martin & Crump, 2003).

1.4.1.1.7.3 - Efeitos no tecido adiposo

Outro alvo importante da insulina é o tecido adiposo. Um acréscimo na sua concentração, estimula o transporte de glicose para dentro dos adipócitos, onde é metabolizada para produção de energia ou para armazenamento de gordura, através da síntese de triacilgliceróis (Martin & Crump, 2003).

1.4.1.1.7.4 - Efeitos no metabolismo proteico e no crescimento

A acção efectiva da insulina na síntese proteica suscita a ideia de que esta tem um papel fundamental no crescimento animal. A este nível, os seus efeitos podem ser de igual importância aos provocados pela GH, podendo estas duas hormonas actuar sinergicamente (Martin & Crump, 2003).

De facto, como já mencionado, a insulina, assim como a GH, tem a capacidade de aumentar a entrada de aminoácidos para dentro das células e inibir o catabolismo proteico. Para além disto, tem a capacidade de actuar directamente nos ribossomas das células, aumentando a translação do ARN mensageiro e permitindo a formação de novas proteínas. Por fim, pode ainda elevar a taxa de transcrição de determinadas sequências de ADN no núcleo celular, com consequente aumento das quantidades de ARN e maior síntese proteica (Guyton & Hall, 2000).

1.4.1.1.8 Factor de crescimento semelhante à insulina (IGF / somatomedina)

A hormona de crescimento é responsável pela formação de pequenas proteínas, chamadas somatomedinas, com forte acção no processo de crescimento. Muitos efeitos destas são semelhantes aos da insulina, sendo por isso também denominadas de “factor de crescimento semelhante à insulina” (IGF) (Guyton & Hall, 2000). Estas pertencem ao sistema IGF, descrito como uma via complexa, a qual compreende dois factores de crescimento (IGF-1 e IGF-2), receptores superficiais das células (IGF-1R e IGF-2R), seis proteínas ligantes de alta afinidade (IGFBP-1 a IGFBP-6), proteases IGFBP e várias outras moléculas que interagem com as proteínas ligantes, com consequente regulação e estimulação da acção da IGF nos tecidos (Chaves & Saif, 2011).

O IGF-1 e o IGF-2 são cadeias polipépticas simples, compostas por 70 e 67 aminoácidos, respectivamente, 70% homólogas, sintetizadas em quase todos os tecidos. Estes apresentam uma estrutura significativamente semelhante à pró-insulina e insulina, em que os domínios α e β dos IGF são 50% idênticos às cadeias α e β da insulina, respectivamente. Contudo, apesar de apresentarem uma acção e estrutura semelhante à insulina, a maioria

dos IGFs são produzidos no fígado e não no pâncreas (Martin & Crump, 2003; Xue & Michels, 2007). Adicionalmente, as suas concentrações em circulação são 1000 vezes superiores à maioria das outras hormonas peptídicas, como por exemplo, a insulina (Chaves & Saif, 2011).

A somatomedina mais importante é a somatomedina C ou, vulgarmente chamada, IGF-1, com um peso molecular de 7500 kDa e com uma concentração plasmática semelhante à GH (Guyton & Hall, 2000). A IGF-1 tem efeitos semelhantes à insulina, contribuindo para a absorção e utilização de glicose no tecido muscular e adiposo. Esta actividade hipoglicemiante manifesta-se apesar do efeito insulinodepressor simultâneo da IGF-1. Contudo, as acções da insulina e do IGF-1 no metabolismo glucídico apresentam uma importante diferença a nível hepático. A capacidade da IGF-1 para inibir a libertação de glicose no fígado é diminuta ou inexistente, provavelmente porque não inibe a libertação de glucagina. Quanto à IGF-2, pensa-se que a maioria dos seus efeitos neste metabolismo é mediada pela ligação e posterior activação dos receptores IGF-1 (Martin & Crump, 2003).

Os receptores da IGF-1 são compostos por duas subunidades α e duas subunidades β , apresentando uma estrutura muito semelhante aos receptores de insulina. Estes receptores ligam-se à IGF-1 e à IGF-2 com alta afinidade, e com menor afinidade à insulina. Pelo contrário, os receptores IGF-2 apresentam uma estrutura marcadamente diferente, com baixa afinidade para o IGF-1 e sem nenhuma ligação com a insulina (Martin & Crump, 2003).

Os receptores de IGF-1, assim como os receptores de insulina, são classificados de receptores transmembranares tirosina cinase. Contudo, a activação do IR provoca principalmente uma resposta metabólica, enquanto a estimulação dos IGF-1R resulta numa evolução celular (Gallagher & LeRoith 2010), isto porque, durante a evolução, estes dois receptores foram desenvolvendo diferentes funções. Resumindo, actualmente os IR encontram-se expressos maioritariamente no tecido adiposo, hepático e muscular, onde exercem funções no metabolismo glucídico e na homeostase, já os IGF-1R, presentes em todas as células, têm uma maior participação no crescimento celular (Lann & LeRoith, 2008). Porém, qualquer dos receptores pode estabelecer uma ligação com a insulina ou com o IGF-1 e mediar os seus efeitos biológicos nas células, embora cada receptor apresente uma maior afinidade com o seu ligante correspondente (Gunter et al., 2009; Novosyadlyy et al., 2010).

O estado activo do IGF-1R, proporcionado pela sua união ao ligante, despoleta a activação das mesmas proteínas e vias que são estimuladas quando a insulina se liga ao IR (Wolf & Rubinek, 2008). As principais vias activadas por estes receptores são a PI3K e a MAPK, responsáveis pela transdução do sinal celular (Novosyadlyy et al., 2010).

A somatomedina C no sangue liga-se fortemente a uma proteína ligante, também produzida em resposta à hormona de crescimento, o que contribui para a sua libertação lenta nos

tecidos. Consequentemente, esta tem uma semi-vida longa, de aproximadamente 20 horas (Guyton & Hall, 2000). Em condições normais, aproximadamente 99% da IGF-1 circulante encontra-se ligada às proteínas ligantes 3 (IGFBP3), havendo apenas 1% de IGF-1 que se encontra livre em circulação para interagir directamente com os receptores (Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, 2010). Contudo, é importante ressaltar que as IGFBP têm uma acção reguladora na actividade da IGF-1 e da IGF-2, evitando a sua catabolização, o que, indirectamente, aumenta a sua disponibilidade para se unir aos receptores. Considera-se ainda que a IGFBP-3 e a IGFBP-5 actuam na proliferação celular e na sensibilidade à apoptose (Gallagher & LeRoith, 2010).

Como a IGF é produzida maioritariamente a nível hepático, é provável que uma redução do IMC resulte numa diminuição da sua síntese, devido ao baixo fornecimento de nutrientes ao fígado. Do mesmo modo, a obesidade também pode provocar uma redução da sua produção hepática por comprometimento do órgão (Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, 2010).

1.4.1.2 Glucagina

Só trinta anos após a descoberta da insulina foi isolado e caracterizado, em 1955, o factor pancreático com funções opostas a esta, a glucagina (Martin & Crump, 2003). Esta hormona, produzida nas células α dos ilhéus de Langerhans, é um polipéptido de cadeia simples, composto por 29 aminoácidos, relativamente homólogos entre as diferentes espécies animais (Greco & Stabenfeldt, 2004).

O gene codificador da glucagina pertence a uma superfamília de genes que também codifica várias outras hormonas, como o GLP-1, GLP-2, o GIP, a secretina e outras hormonas digestivas (Martin & Crump, 2003).

O valor glicémico é o maior factor regulador da sua secreção pelas células α , aumentando esta em períodos de hipoglicémia e diminuindo durante as fases de hiperglicémia. É assim que, em estreita relação com a insulina, a glucagina contribui para a manutenção da homeostase glucídica (Greco & Stabenfeldt, 2004).

Também valores elevados de aminoácidos, resultantes da ingestão de uma dieta proteica, provocam a produção e libertação de glucagina. Deste modo, e na ausência da ingestão de carboidratos, a glucagina aumenta a glicémia através de gliconeogénese. A secreção de glucagina é ainda estimulada pelo sistema nervoso simpático e pela administração de catecolaminas (Martin & Crump, 2003).

Os seus efeitos, opostos aos da insulina, têm lugar maioritariamente no fígado, onde estimula a glicogenólise e a gliconeogénese, e inibe a glicogénese (Greco & Stabenfeldt, 2004). Esta hormona, ao contrário da adrenalina, não actua no glicogénio muscular.

A sua acção, assim como a da maioria das hormonas proteicas, resulta da sua ligação inicial a um receptor na superfície das células, com consequente activação da adenilciclase que aumenta a síntese de cAMP (Kaneko, 1997).

Esta, para além dos efeitos hiperglicémicos, estimula também a síntese e libertação de insulina pelas células β e promove a lipólise de triglicéridos nos adipócitos (Martin & Crump, 2003).

1.4.2 Outras hormonas

Para além da insulina e da glucagina, torna-se necessário referir diversas outras hormonas, que influenciam também o metabolismo glucídico, e compreender melhor como é que elas o afectam.

1.4.2.1 Somatostatina

A somatostatina foi identificada em vários tecidos, como o hipotálamo, o tracto gastrointestinal e as células δ dos ilhéus de Langerhans do pâncreas (Martin & Crump, 2003). A sua acção resulta não só na inibição da libertação de todas as hormonas do pâncreas endócrino, tais como a insulina e a glucagina, mas também na redução da secreção da hormona de crescimento (Greco & Stabenfeldt, 2004; Kaneko, 1997).

A sua libertação pelas células δ é estimulada pela glicose, aminoácidos, ácidos gordos, hormonas gastrointestinais, glucagina, e neurotransmissores colinérgicos e β -adrenérgicos, e é inibida pela insulina e pelos neurotransmissores α -adrenérgicos. A observação do seu baixo nível glicémico e da sua distribuição ubiqüitária permite-nos aferir que as suas acções são primariamente parácrinas (Martin & Crump, 2003).

1.4.2.2 Amilina

A amilina, um peptídeo com 37 aminoácidos, isolada dos depósitos amilóides do pâncreas, é uma hormona neuroendócrina expressa e secretada juntamente com a insulina pelas células β , embora em muito menor quantidade (Aronoff et al., 2004). Por esta razão, a sua presença apresenta-se diminuída em doentes com diabetes tipo I e aumentada em pacientes com diabetes tipo II. Por isso, uma grande parte dos gatos domésticos e dos humanos com esta doença apresentam uma substituição das células β pancreáticas por depósitos amilóides, tanto mais evidente quanto maior a quantidade de amilina libertada. A longo prazo esta alteração contribui para a diminuição das células β e para a consequente falha na produção de insulina (Rand, 2007).

Considera-se que esta hormona, em condições normais, actua em consonância com a insulina, contribuindo para a manutenção da homeostase glicémica. A sua acção resulta principalmente de dois mecanismos: a supressão da secreção de glucagina pós-prandial e a redução da taxa de esvaziamento gástrico. Para além destes efeitos, a administração de doses de amilina reduz a ingestão de comida e o peso dos modelos animais (Aronoff et al., 2004).

1.4.2.3 Catecolaminas

As catecolaminas são libertadas a título constante pela medula da glândula adrenal. Em períodos de grande necessidade, perante situações de stress, a sua secreção aumenta grandemente. A adrenalina é o mediador da actividade pós-ganglionar do sistema nervoso simpático e a noradrenalina é o neurotransmissor deste mesmo sistema. Ambas são libertadas quando as fibras pré-ganglionares estimulam a adrenal (Greco & Stabenfeldt, 2004).

A sua actividade altera a glicémia através de diversos mecanismos, tais como:

- diminuição da secreção de insulina pelas células β e consequente redução da utilização de glicose, através da estimulação α 2-adrenérgica;
- aumento da secreção de insulina pelas células β pela estimulação β -adrenérgica;
- aumento da glicogenólise nos hepatócitos por estimulação β 2-adrenérgica;
- aumento da libertação da hormona de crescimento pela hipófise por estimulação α 1-adrenérgica (Scott & Stockham, 2002).

Contudo, os seus efeitos metabólicos são mediados principalmente pelos receptores β 2-adrenérgicos. A adrenalina, 10 vezes mais potente que a noradrenalina a este nível, tem um papel primordial. De um modo geral, esta apresenta um efeito semelhante ao do glucagina e oposto ao da insulina no metabolismo glucídico. Embora actue principalmente no fígado, onde promove a glicogenólise e gliconeogénese, também estimula a glicogenólise muscular, ao contrário da glucagina (Greco & Stabenfeldt, 2004).

1.4.2.4 Glicocorticóides

Os glicocorticóides são produzidos na zona fascicular e, em menor escala, na zona reticular do córtex da glândula adrenal, para além de terem ainda uma síntese não regulada no tecido adiposo (Bender & Mayes, 2006a; Greco & Stabenfeldt, 2004). Estes, assim como as catecolaminas, também apresentam um papel importante na regulação do metabolismo glucídico, sendo responsivos positivamente a factores de stress. O cortisol é o glicocorticóide dominante.

Um dos seus principais mecanismos de acção é a estimulação da gliconeogénese hepática com consequente aumento do glicogénio hepático e dos valores glicémicos. Os animais com hiperadrenocorticism, onde se manifesta um excesso de produção destas hormonas, são bons exemplos deste efeito. Contudo, a sua influência metabólica é permissiva, ou seja, a sua presença é necessária para que a glucagina e a adrenalina promovam a gliconeogénese e glicogenólise, respectivamente (Graves, 2010a; Greco & Stabenfeldt, 2004).

Para além disto, os glicocorticóides apresentam um efeito anti-insulínico, reduzindo o número e a eficácia dos transportadores de glicose e contribuindo para o aumento das concentrações séricas de glucagina e ácidos gordos. Um bom exemplo deste efeito é o desenvolvimento de diabetes mellitus por administração crónica de glicocorticóides (Knottenbeld, 2005).

Adicionalmente, estas hormonas apresentam ainda uma acção directa no tecido adiposo, com aumento da taxa de lipólise e com redistribuição de gordura, e uma influência positiva no catabolismo proteico. Este segundo processo, que pode resultar num enfraquecimento muscular, garante a gliconeogénese hepática graças aos aminoácidos libertados (Greco & Stabenfeldt, 2004).

1.4.2.5 Hormona de crescimento (GH)

A libertação da hormona de crescimento, produzida na hipófise, e na glândula mamária de cadelas inteiras, é estimulada pela progesterona e pela hipoglicémia (Bender & Mayes, 2006a) (Knottenbeld, 2005).

Em diversas espécies há uma elevação da sua concentração quando o organismo é exposto a períodos prolongados de jejum. A sua acção antagonista da insulina, com consequente aumento dos valores de glicémia mesmo perante níveis séricos de insulina normais, é provocada por uma redução no número de receptores de insulina periféricos e pela supressão do transporte de glicose para o interior das células. Possivelmente, este segundo parâmetro é mediado por uma diminuição na expressão dos genes que codificam os transportadores de glicose (Greco & Stabenfeldt, 2004; Knottenbeld, 2005). Consequentemente, há uma absorção diminuta de glicose nos miócitos e adipócitos (Scott & Stockham, 2002). Esta hormona estimula ainda a produção de glicose no fígado e a lipólise de adipócitos (Knottenbeld, 2005).

1.4.2.6 Progesterona

A progesterona, produzida pelo corpo lúteo, grávido ou não, durante o diestro, apresenta uma actividade antagonista à insulina, desenvolvendo uma intolerância aos carboidratos.

Esta hormona reduz não só a ligação de insulina aos seus transportadores plasmáticos mas também o transporte de glicose nos tecidos periféricos. Adicionalmente, estimula a secreção da GH nos cães, mas não nos gatos.

É por isso que, a administração exógena de progestagénios e a presença de tumores adrenocorticais, secretores de progesterona, podem provocar insulino-resistência e consequente desenvolvimento de diabetes mellitus (Felman & Nelson, 2004; Knottenbeld, 2005).

1.4.2.7 Hormonas da tiróide

As hormonas da tiróide (T3 e T4) têm uma acção diversificada no metabolismo glucídico, seguidamente descrita: aumentam a absorção intestinal de glicose, facilitam o seu movimento para dentro das células adiposas e musculares, e potenciam a captação desta quando mediada pela insulina.

Em pequenas quantidades favorece a glicogénese, enquanto que em grandes quantidades precipita a glicogenólise (Greco & Stabenfeldt, 2004).

1.5 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO GLUCÍDICO

Diversas doenças provocam alterações no metabolismo glucídico, com frequentes variações nos valores de glicémia, sendo a hiperglicémia e a hipoglicémia achados laboratoriais comuns (Evans & Duncan, 2003).

Embora existam vários testes laboratoriais disponíveis para avaliar os principais parâmetros metabólicos, o principal e mais utilizado continua a ser a medição de glicose no sangue (Kaneko, 1997).

1.5.1 Determinação de glicémia

A medição da glicémia pode ser realizada pelo dono, em casa, ou pelo médico veterinário, na clínica, através da utilização do glucómetro. Este método é normalmente preciso, rápido, não dispendioso e simples, necessitando apenas de uma gota de sangue. Porém, pode haver uma redução na sua precisão quando os níveis de glicémia são muito baixos (≤ 70 mg/dl) ou quando, dentro da normalidade, se encontra perto dos valores limiares.

A sua determinação também pode ser conseguida com recurso a métodos laboratoriais rotineiros, frequentemente através do método da hexoquinase (Hoenig, 2005; Nelson, Turnwald & Willard, 1999). Os resultados obtidos deste modo, por analisadores automáticos, são tendencialmente mais precisos que os primeiros, apresentando valores superiores em 18-36 mg/dl (Rand & Marshall, 2005).

A glicose está apenas presente no plasma, por isso, quando usamos sangue total a sua concentração é influenciada pelo hematócrito, encontrando-se exemplificativamente sobrestimada em animais anémicos. Consequentemente, os valores obtidos no plasma ou no soro são superiores aos obtidos no sangue total (Knottenbeld, 2005).

A concentração de glicose sanguínea nas artérias e capilares é superior à encontrada nas veias, uma vez que esta é consumida pelos tecidos periféricos. Assim, nos animais com níveis de glicémia e insulinémia normais, a variação de glicémia entre estes vasos sanguíneos é inferior ou igual a 10mg/dL (Scott & Stockham, 2002).

Também, se o intervalo de tempo entre a colheita e a medição for superior a 30 minutos, o soro ou o plasma deve ser separado dos eritrócitos e leucócitos. À temperatura de 22°C, a concentração de glicose diminui 10% a cada 30 ou 60 minutos, podendo este fenómeno ocorrer de forma ainda mais rápida quando maiores concentrações de células metabolicamente activas estão presentes. Alternativamente, podemos utilizar uma solução anticoagulante de fluoreto de oxalato, capaz de prevenir o consumo de glicose pelas células, através da inibição enzimática (Evans & Duncan, 2003; Nelson et al, 1999). Contudo, este anticoagulante interfere com a reacção enzimática em alguns glucómetros, devendo apenas ser usados para posteriores medições laboratoriais (Knottenbeld, 2005).

Para uma interpretação fidedigna, é também importante entrar em nível de conta com diversos parâmetros que podem interferir no resultado, tais como:

- Os factores de stress: a excitação causada antes ou durante a colheita, principalmente em gatos, resulta numa hiperglicémia transitória por elevação das catecolaminas;
- A ingestão de alimentos: a medição deve ser realizada pelo menos 12 horas após a alimentação para evitar completamente uma possível hiperglicémia pós-prandial.
- A lipémia: a sua presença, comum em animais diabéticos, interfere de forma notória com a medição de glicose em alguns testes.
- Os fármacos: evitar a utilização de determinados sedativos, como a medetomidina, que reduz a produção de insulina, e como a cetamina, que está associada a libertação de hormonas de stress; animais que tomam progestagénios e glicocorticóides podem apresentar resistência à insulina (Evans & Duncan, 2003; Knottenbeld, 2005).
- outros: exercício físico, doenças concomitantes e secreção de hormonas contra-reguladoras (Bates, Bain, Krimer & Latimer, 2003).

1.5.2 Glicosúria

A análise da presença de glicose na urina foi o primeiro método utilizado no controlo da glicémia. A glicose, filtrada livremente nos glomérulos, é reabsorvida de forma activa pelos túbulos proximais. Contudo, a capacidade de reabsorção é limitada, por isso, quando a sua concentração ultrapassa o limiar de excreção renal, esta pode ser encontrada na urina em

quantidade proporcional (Reusch, 2010). O limiar de excreção renal é de 180mg/dl no cão e de 280mg/dl no gato (Evans & Duncan, 2003).

A sua medição pode ser obtida por urianálise, em laboratório, ou através da utilização de tiras reactivas, que mudam de cor conforme a quantidade de glicose presente (Hoenig, 2005). A determinação da glicosúria é um método utilizado para identificar hiperglicémias induzidas por stress. Isto porque, embora quadros de excitação causem um acréscimo nos valores de glicémia, estes não chegam a causar glicosúria, excepto em alguns gatos com elevados níveis de stress (Bates et al., 2003).

Porém, esta forma de medição apresenta algumas limitações: o seu resultado não reflecte o valor de glicémia actual; um resultado negativo não permite a distinção entre hipoglicémia, normoglicémia ou hiperglicémia ligeira; o estado de hidratação, assim como a concentração de urina, afecta o resultado (Reusch, 2010).

1.5.3 Proteínas glicadas

As proteínas glicadas são produto de uma ligação covalente irreversível entre as moléculas de glicose e aminoácidos de uma proteína, através de um mecanismo de glicosilação não enzimático. Quando a proteína é a hemoglobina (Hb) obtemos a hemoglobina-glicada, da qual medimos especificamente a fracção HbA1. Se a proteína do complexo é a albumina, ou outra proteína do soro, o produto resultante é denominado frutossamina (FrAm) (Bates et al., 2003; Kaneko, 1997). A semi-vida da proteína integrante reflecte o período de tempo ao qual corresponde os valores de glicémia obtidos por este processo. Assim, a sua medição permite-nos obter informações do valor de glicémia a longo prazo. As alterações na concentração das proteínas glicadas são influenciadas pela variação na concentração de glicose e pela duração desta variação (Knottenbeld, 2005).

1.5.3.1 Hemoglobina glicada

A semi-vida da hemoglobina glicada, correspondente à semi-vida dos eritrócitos, é de aproximadamente seis semanas no gato e de oito a dez semanas nos cães. A elevação nos valores desta proteína glicada é o reflexo de uma hiperglicémia presente durante os meses anteriores e, por isso, não sofre influência de stress transitório ou da prévia ingestão de alimento. A sua concentração em gatos e cães saudáveis é de 0,8 – 1,9% e de 1,8 – 4,9%, respectivamente, e a sua medição é feita através de um teste de cromatografia por afinidade. A amostra de sangue deve ser colhida para tubos de heparina ou de EDTA e pode ser refrigerada, até realização de análise, durante o período de uma semana (Hoenig, 2005).

Habitualmente, a HbA1 não é o parâmetro mais usado para a medição de glicémia em cães e gatos porque o teste tem pouca aplicabilidade nestas espécies (Bates et al., 2003), para além de que, os métodos e os equipamentos utilizados, assim como o trabalho envolvido, são complexos (Kaneko, 1997).

Embora a sua medição tenha utilidade na monitorização da glicémia em cães, os seus valores podem apresentar-se normais em casos de diagnóstico recente de diabetes mellitus. Nos gatos a sua concentração é menor e deve-se, possivelmente, a uma semi-vida mais curta dos seus eritrócitos ou são consequência de um menor número de locais de ligação da hemoglobina felina à glicose. Consequentemente, tanto nos cães como nos gatos, é preferível realizar a medição de frutossamina (Knottenbeld, 2005).

Por fim, como a concentração de HbA1 se encontra directamente relacionada com a concentração de eritrócitos, quando fazemos uma leitura dos resultados é necessário saber se existe um quadro de anemia ou policitémia. Animais com anemia terão valores mais baixos de HbA1 e com policitémia terão elevações falsas (Knottenbeld, 2005).

1.5.3.2 Frutossamina

As frutossaminas são complexos estáveis de carboidratos e proteínas, sendo que nos cães a proteína com maior afinidade é a albumina, enquanto nos gatos são as globulinas (Bates et al., 2003). Com base na semi-vida destas proteínas, assume-se que a concentração de frutossamina espelha os valores de glicémia de um período passado, de uma a duas semanas (Reusch, 2010). Este intervalo de tempo, comparativamente mais curto do que o da HbA1, permite detectar alterações glicídicas mais rapidamente, tornando este teste mais vantajoso (Kaneko, 1997). Contudo, tem uma semi-vida suficientemente longa para não ser influenciado por rápidas flutuações nos valores de glicémia, como frequentemente ocorre nas já referidas hiperglicémias de stress em gatos (Hoenig, 2005). Variados estudos têm demonstrado que um aumento na concentração de frutossamina, com valores superiores aos limites de referência, só se manifesta, pelo menos, 3 a 5 dias após uma hiperglicémia marcada e permanente, sendo este período ainda mais longo em gatos com hiperglicémia moderada (Reusch, 2010).

Embora os limites de referência variem conforme os laboratórios e a população animal, normalmente estes encontram-se entre os 100 e os 400 $\mu\text{mol/L}$. Existem algumas evidências de que estes valores de referência têm aumentado nos últimos anos, o que pode indicar um aumento das concentrações glicémicas nos animais (Hoenig, 2005). A medição da sua concentração no sangue é realizada através de uma técnica colorimétrica com base no corante nitroazul tetrazólio. Este teste laboratorial, comercialmente disponível, é rápido, adaptável, relativamente barato, facilmente automatizado, requer pouco trabalho e permite um resultado mais preciso do que outros testes (Bates et al., 2003).

Apenas as amostras de soro do sangue colhido podem ser usadas para a medição de frutossamina (Knottenbeld, 2005), o qual é um requisito que confere uma vantagem adicional a este teste. As amostras de soro podem ser congeladas e, por isso, conservadas durante mais tempo, ao passo que as amostras de sangue total para a medição da hemoglobina glicada apenas podem ser refrigeradas (Hoenig, 2005).

Porém, assim como na HgA1, existem factores que alteram a sua concentração e que devem ser tidos em conta na leitura dos resultados. As reduções nas proteínas do soro são capazes de provocar, parcialmente, diminuição nos valores da frutossamina. O hipertiroidismo, comum em gatos, aumenta a reposição de proteínas e, conseqüentemente, diminui a concentração de frutossamina, enquanto que cães com hipotiroidismo podem mesmo apresentar um aumento da sua concentração. A azotémia em cães normoglicémicos tem também sido associada a um número reduzido de frutossamina, devido à desnaturação da proteína (Knottenbeld, 2005).

1.5.4 Medição da insulinémia

A medição de insulina pode ser útil para confirmar a presença de um insulinoma ou para determinar o funcionamento das células β em animais com diabetes mellitus. Contudo, este método apresenta algumas desvantagens, tais como: muitas variáveis afectam a sua concentração, a sua interpretação só deve ser feita em conjunto com a correspondente medição de glicémia e alguns testes radioimunoensaio (radioimunoassay, RIA) não são efectivos em gatos (Nelson et al., 1999).

Quando realizamos testes de medição imunológica da insulina o termo insulina imunorreactiva (immune-reactive, IRI) é preferível, isto porque a contagem pode também abranger a pró-insulina e porque a quantidade obtida encontra-se em unidades imunorreactivas e não em unidades de actividade biológica. Na elaboração da sua análise recorre-se maioritariamente a *kits* comerciais RIA. É por isso que, a presença de anticorpos anti-insulina, resultantes de um processo patológico ou de um tratamento com insulina exógena, pode resultar num aumento falseado dos valores. Alguns testes de imunoabsorção enzimática (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) podem também ser utilizados.

A sua medição deve ser preferencialmente realizada durante períodos de jejum, de modo a reduzir os efeitos estimuladores da libertação de insulina, aquando da ingestão de alimento. A IRI pode ser medida em plasma heparinizado ou, preferencialmente, em soro. Quando esta medição ocorre em plasma colhido em tubos de EDTA, alguns ensaios podem resultar em valores erroneamente elevados. Considera-se que as concentrações de insulina se mantêm estáveis numa amostra de sangue total durante, pelo menos, 5 horas. Se são conservadas em soro, mantêm valores constantes durante 7 dias a 4°C ou durante vários meses a -20°C (Scott & Stockham, 2002).

Os valores normais de insulina variam entre os 5 e os 20 $\mu\text{UI/ml}$ (Nelson et al, 1999). Quantidades superiores a 20 reflectem hiperinsulinémia absoluta, consistente com insulinoma. Se os valores variarem entre 10 e 20 a sua interpretação é de hiperinsulinémia relativa, também coincidente com insulinoma. Resultados entre 5 e 10 ainda podem também ser consequência desta doença tumoral, mas valores inferiores são inconsistentes com este diagnóstico (Knottenbeld, 2005).

- Rácio IRI:glicose

Considerando que os valores de glicémia influenciam a produção e libertação de insulina, o rácio IRI:glicose permite-nos concluir se a quantidade de IRI medida é adequada ao nível de estimulação pela glicose (Scott & Stockham, 2002):

$$\text{IRI:Glicose} = \text{IRI } (\mu\text{UI/mL}) \times 100 / \text{Glicose (mg/dL)}$$

Valores de rácio superiores a 4,2 $\mu\text{UI/mol}$ suportam o diagnóstico de insulinoma (Knottenbeld, 2005).

1.5.5 Testes de tolerância

1.5.5.1 Teste de tolerância à glicose

Os testes de tolerância à glicose resultam na realização de uma curva de glicémia, após administração de glicose por via oral ou endovenosa, que pode ser usada para detectar hiperinsulinémia. Quando a tolerância à glicose se encontra aumentada, há um aumento limitado dos valores deste monossacarídeo e rapidamente a sua concentração sanguínea diminui. Se o animal apresenta uma tolerância reduzida, observa-se um aumento excessivamente alto e um retorno lento aos níveis basais, não aceitando bem a administração de doses extras de glicose.

1.5.5.1.1 Via oral

Os testes realizados por via oral resultam da realização de uma colheita de sangue em jejum, seguida da ingestão de glicose na dose de 1,75 g/Kg, e posteriores colheitas de sangue de 30 em 30 minutos, durante 3 horas. Se não se atingirem os valores máximos de glicémia suspeita-se de uma má absorção intestinal, falha no esvaziamento gástrico ou vômito. Aumentos de tolerância à glicose podem ser observados em casos de hipotireoidismo, insuficiência da glândula adrenal, hipopituitarismo e hiperinsulinémia. Atrasos no tempo que a glicémia demora a voltar aos valores basais sugerem intolerância à glicose,

concordante com diabetes mellitus, hiperadrenocorticismo, hipertiroidismo e insuficiência hepática.

1.5.5.1.2 Via endovenosa

O processo alternativo consiste na administração de glicose, na dose de 1,0 de g/ Kg, por via endovenosa, após colheita de uma amostra sanguínea em jejum, e seguida de colheitas de sangue aos 5, 15, 25, 35, 45 e 60 minutos, após esta administração. Em gatos, uma amostra adicional é ainda obtida aos 120 minutos. Neste caso, uma demora na redução dos valores de glicémia também traduz intolerância à glicose, com causas idênticas às enunciadas anteriormente.

Adicionalmente, podemos analisar as variações de insulinémia que, em condições normais, atinge o seu pico aos 15 minutos e retorna aos valores basais aos 60 minutos, na maioria das espécies, ou aos 120 minutos, nos gatos (Evans & Duncan, 2003) (Kaneko, 1997).

1.5.5.2 Teste de tolerância à insulina

Este teste mede a sensibilidade dos níveis de glicémia à administração de uma dose protocolar de insulina, e a resposta do organismo à hipoglicémia daí resultante. Segundo os parâmetros normais, a glicose presente no sangue diminui para metade 20 a 30 minutos após a administração de insulina e retorna aos valores de referência numa hora e meia ou duas horas. Se a sua quantidade não reduzir em 50 %, ou se demorar mais tempo a fazê-lo, significa que existe resistência à insulina. Embora este teste não costume ser usado em cães e gatos com diabetes tipo II, poderá ter interesse fazê-lo, como forma de avaliar esta resistência. Em casos em que há um intervalo de tempo aumentado até que os valores de glicémia retornem ao normal, estamos perante uma hipoglicémia não responsiva, presentes em casos de hiperinsulinémia, ou de insuficiência da adrenal ou da hipófise (Kaneko, 1997).

1.5.5.3 Teste de estimulação do glucagina

A administração de glucagina estimula a libertação de insulina, devido quer ao consequente aumento de glicose, quer à acção directa nas células β . O teste de estimulação do glucagina baseia-se neste princípio e pode ser usado para diagnóstico de diabetes em gatos. Nestes, o pico de insulina é obtido aos 15 minutos, retomando os valores iniciais ao fim de uma hora. A curva de insulina encontra-se plana nos raros casos de diabetes tipo I em gatos (Kaneko, 1997).

1.5.5.4 Teste de tolerância à adrenalina

Quando injectamos adrenalina obtemos uma hiperglicémia, resultante de uma glicogenólise hepática, que atinge o seu valores máximo, 50% superior ao normal, em 40 a 60 minutos. A glicémia retoma os valores normais ao fim de uma hora e meia, duas horas. Este teste é usado como um critério de avaliação da disponibilidade do glicogénio hepático para a produção de glicose sanguínea (Kaneko, 1997).

2. INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES GLUCÍDICAS NO TUMOR MAMÁRIO

Actualmente, existem algumas evidências de que a glicose e outros factores relacionados com o metabolismo glucídico, tais como as concentrações de insulina e de IGF, contribuem para a promoção, o desenvolvimento e a progressão de tumores mamários, tanto nos animais como no homem (Muti et al., 2002) (Lann & LeRoith, 2008). Contudo, a possibilidade de uma relação entre a hiperglicémia, a diabetes mellitus e os tumores mamários já tinha sido sugerida há mais de um século. Com efeito, em 1885, foram registados valores aumentados de glicose em pacientes com tumor e, desde os anos 50, tem sido descrito que, as mulheres com neoplasia mamária, apresentam taxas de prevalência de diabetes mellitus comparativamente mais elevadas (Xue & Michels, 2007).

Vários estudos epidemiológicos têm sugerido que doentes com diabetes mellitus tipo II apresentam um risco significativamente maior, em cerca de 10 a 20%, de desenvolver tumores mamários, para além de serem também associados a um pior prognóstico (Wolf & Rubinek, 2008; Wu, Yu, Tseng, Stanczyk & Pike, 2007). A diabetes mellitus tipo II é responsável por variadas alterações, tais como a presença de obesidade abdominal, hiperglicémia, intolerância à insulina, e induz algumas alterações a nível hormonal, tais como variações nos valores de insulina, de IGF, de estrogénios e de citocinas (Xue & Michels, 2007). Todas estas alterações podem justificar a possível associação entre as duas doenças.

Através da análise da diabetes mellitus tipo II e da neoplasia mamária, conclui-se que existem diversos factores de risco comuns a ambas, como a obesidade e o sedentarismo, que podem confundir e tornar difícil a avaliação do risco de cancro em pacientes diabéticos (Vigneri, Frasca, Sciacca, Pandini & Vigneri, 2009).

A elevada frequência de tumores mamários diagnosticados em Medicina Humana e Veterinária, a alta taxa de casos de diabetes mellitus tipo II em humanos e felídeos domésticos e o aumento da incidência destas duas doenças, nos últimos 20 anos, a nível humano, são factores que valorizam a análise desta possível correlação (Fan, 2007; Lipscombe, Goodwin, Zinman, McLaughlin & Hux, 2006b; Misdorp, 2002; Rand, 2009).

2.1 FACTORES DE RISCO COMUNS À DIABETES TIPO II E AO TUMOR MAMÁRIO

Considera-se que os aumentos crónicos de glicémia e de insulinémia são factores de risco para o desenvolvimento tumoral e têm, possivelmente, um peso preponderante a este nível (Grote et al., 2010). Contudo, tem sido largamente questionado se a associação entre a diabetes mellitus e o desenvolvimento de algumas neoplasias malignas se deve maioritariamente aos seus factores de risco comuns ou às alterações metabólicas anteriormente referidas.

A idade, o sexo, a inactividade física e a dieta são potenciais factores de risco comuns nos pacientes oncológicos e nos pacientes diabéticos, sendo de particular interesse, nos doentes com cancro mamário, a obesidade e a vida sedentária (Giovannucci et al., 2010) (Xue & Michels, 2007).

Segundo Abbasi, Tarafdari, Esteghamati, Vejdani & Nakhjavani (2010), a idade e a obesidade central têm um efeito significativo na relação entre a presença de uma massa mamária e a resistência à insulina. Adicionalmente, as perdas de peso e o aumento da actividade física podem contribuir para a redução do risco de tumor mamário, possivelmente devido à redução dos valores de insulina e de estrogénios (Gunter et al., 2009). Apesar de uma observação clara de que a redução da adiposidade, a ingestão de uma dieta saudável e o exercício físico regular reduzem o risco de diabetes mellitus tipo II e de diversos tipos de tumor, estes factores encontram-se frequentemente inter-relacionados, o que dificulta a observação da contribuição singular de cada um.

Consequentemente, para uma melhor compreensão dos diversos factores envolvidos, torna-se necessário a realização de futuros estudos em pacientes com um peso corporal normal mas com uma vida sedentária ou com uma manifesta hiperinsulinémia, assim como em obesos com parâmetros metabólicos normais (Giovannucci et al., 2010).

2.1.1 Idade

Na grande maioria dos tumores, a sua incidência aumenta com a idade, muito embora alguns tipos específicos tenham maior predominância nos primeiros anos de vida. Do mesmo modo, também o número de casos de diabetes, em particular do tipo II, cresce com a faixa etária, apesar desta doença surgir cada vez mais cedo, devido a obesidade infantil (Giovannucci et al., 2010).

2.1.2 Actividade física

Alguns estudos epidemiológicos concluíram que, o aumento da actividade física está associado a um menor risco de desenvolvimento de cancro da glândula mamária, do cólon e do endométrio. Estes estudos também sugerem que a realização de exercício físico, mesmo depois do diagnóstico, pode aumentar a sobrevivência no caso de alguns tumores, entre os quais, o mamário. Paralelamente, tem sido demonstrada a acção protectora da actividade física na fisiopatologia da diabetes e nos seus consequentes efeitos. O “*Diabetes Prevention Program*” indica que há uma redução no risco de diabetes, mesmo naqueles que não atingem os objectivos de redução de peso, desde que cumpram o programa de actividade física estabelecida (Giovannucci et al., 2010).

2.1.3 Obesidade

Nos últimos anos, nos países desenvolvidos, são cada vez mais os casos de obesidade que são capazes de influenciar o aparecimento de cancro (Poliak, 2009).

Actualmente, reconhece-se que o excesso de peso ou que a obesidade é um factor de risco no desenvolvimento de várias neoplasias malignas, como o cancro do cólon, do recto, do endométrio, do pâncreas, do fígado e, em particular, das glândulas mamárias. Adicionalmente, estudos realizados em animais demonstram que a obesidade se encontra também associada a um pior prognóstico. Também está descrito que os tumores tendem a ser mais agressivos em animais sobrealimentados comparativamente com animais sujeitos a restrições calóricas (Cleary, Grossmann & Ray, 2010; Giovannucci et al., 2010). Contudo, este aumento na incidência e na mortalidade varia conforme a distribuição de gordura no organismo, sendo a obesidade central mais nociva do que a obesidade ginoide (Vigneri et al., 2009). É, no entanto, ainda pouco claro se uma limitação na obesidade terá reflexos logo nas primeiras fases da carcinogénese ou se apenas previne uma progressão mais rápida do cancro (Poliak, 2009).

A obesidade é responsável por um aumento da adiposidade corporal e pela secreção hormonal a si associada, estando também relacionada com o desenvolvimento de uma resistência à insulina, que pode resultar em Diabetes mellitus tipo II, ou ainda com a promoção de uma inflamação crónica. No entanto, o papel relativo de cada uma destas situações na carcinogénese não é clara (Nunez et al., 2006).

Torna-se, assim, necessário clarificar quais os principais mecanismos resultantes da presença de obesidade que influenciam o crescimento neoplásico. São poucas as evidências que suportam a ideia de que alterações nos valores de glicémia, lipidémia e ainda outros compostos presentes no sangue, resultantes da ingestão de alimentação excessivamente calórica, têm um efeito directo no metabolismo energético celular. Contrariamente, existem várias provas de que diversas alterações endócrinas, resultantes da elevada absorção calórica, influenciam positivamente a génese e o desenvolvimento tumoral (Poliak, 2009). Estas alterações compreendem o aumento, a nível tecidual e circulatório, dos níveis de insulina, de IGF-1, de outros factores de crescimento, de citocinas inflamatórias e de hormonas sexuais, além de alterações nos valores de adipocinas, como a leptina e a adiponectina (Novosyadlyy, 2010).

2.1.3.1 Hormonas sexuais

Existe uma estreita correlação entre a obesidade, os estrogénios circulantes e o aumento do risco de cancro mamário em humanos. As mulheres obesas na menopausa habitualmente manifestam valores mais elevados de estrogénios e estradiol, possivelmente como

consequência de um aumento da actividade da aromatase no tecido adiposo (Vigneri et al., 2009). A obesidade não está só associada a um aumento na produção destas hormonas, mas também a uma redução na síntese hepática da globulina ligante de hormonas sexuais, o que resulta em elevados níveis de estradiol livre em circulação (Wolf et al., 2006).

2.1.3.2 Adipocinas

O excesso de peso também resulta em variações na produção de várias adipocinas. Entre estas, considera-se que o aumento da leptina e a redução da adiponectina promovem a carcinogénese ao nível da glândula mamária (Alokail, Al-Daghri, Al-Attas & Hussain, 2009). A concentração de leptina encontra-se aumentada na obesidade devido a um aumento da resistência a esta adipocina. Esta apresenta um papel importante na regulação do balanço energético e na saciedade (Graves, 2010b). Os receptores de leptina encontram-se expressos nas células cancerígenas do tumor mamário e a adição desta hormona promove a sua sinalização a este nível, assim como a proliferação celular. Também a presença de receptores de leptina nas neoplasias está, possivelmente, associada a um pior prognóstico (Cleary et al., 2010).

A adiponectina apresenta diversas funções e uma das mais importantes é conferir sensibilidade celular à insulina. Deste modo, os valores aumentados de gordura e os consequentes decréscimos de adiponectina, contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina (Graves, 2010b). Ao nível das células do epitélio mamário a adiponectina é capaz de exercer uma acção protectora, visto que a sua adição a diferentes linhas celulares do tumor mamário inibe a proliferação das células e favorece a apoptose (Vigneri et al., 2009).

2.1.3.3 Citocinas

Para além das hormonas anteriormente referidas, também as citocinas inflamatórias são secretadas pelo tecido adiposo. A obesidade tem sido cada vez mais considerada como uma inflamação sub-clínica (Graves, 2010b) e observa-se uma infiltração acrescida de compostos inflamatórios no tecido adiposo, tais como a interleucina-6 (IL-6), a proteína C-reativa (C-reactive protein, CRP) e o factor de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α), os quais apresentam um efeito promotor do tumor mamário.

Um aumento nos níveis de IL-6 pode interferir com a sinalização da insulina e promover uma resistência a esta. Esta citocina regula ainda a produção hepática de CRP, a qual é um factor de risco na resistência à insulina no cancro mamário, entre outras doenças. A CRP apresenta também uma correlação positiva com a leptina e uma correlação negativa com a adiponectina, o que contribui para a promoção da carcinogénese. O efeito estimulador do

TNF- α e da IL-6 na tumorigénese do tecido mamário tem também sido demonstrado *in vivo* (Alokail et al, 2009).

2.2 Factores de risco independentes resultantes do metabolismo glucídico

Alguns estudos apontam para a hipótese de que a glicose e a insulina sejam factores de risco independentes que actuam ao nível da carcinogénese mamária (Kabat et al., 2009).

Num estudo realizado por Lawlor, Smith & Ebrahim (2004), as mulheres com um diagnóstico de tumor mamário apresentavam valores mais elevados de insulina, de glicose e uma maior insulino-resistência, do que mulheres sem a doença. Para além disso, as primeiras demonstravam uma probabilidade maior de manifestar diabetes mellitus ou de terem uma história de diabetes gestacional ou de glicosúria durante a gravidez. Perante estas observações, colocou-se a hipótese de existir uma associação positiva entre os níveis de insulina, de glicose, a presença de insulino-resistência e de diabetes mellitus, e o risco de cancro mamário.

A diabetes mellitus tipo II, em particular, tem vindo a ser relacionada com um pior prognóstico do tumor mamário, num número cada vez maior de estudos. Calcula-se que 16 a 20% destes doentes neoplásicos são diabéticos, e que mais de 30% tem um quadro de diabetes mellitus não diagnosticada (Erickson et al., 2010).

Segundo Kabat et al. (2009), a insulina propicia a proliferação celular e favorece a carcinogénese nas glândulas mamárias. Já a glicose potencia a insulino-resistência, suporta a selecção de clones malignos e promove o crescimento favorável de células tumorais. Perante a constatação destes mecanismos, considera-se provável que valores relativamente aumentados de glicose e insulina tenham um papel significativo na carcinogénese.

2.2.1 Hiperinsulinémia

A acção da insulina na promoção do crescimento tumoral foi primeiramente demonstrada por um estudo realizado por Heuson & Legros (1972), há mais de 30 anos atrás, em animais de laboratório. Contudo, embora diversos estudos tenham sido realizados a fim de estabelecer uma associação positiva entre os tumores mamários e a diabetes mellitus tipo II, poucos trabalhos têm sido elaborados, desde então, para avaliar a sua relação directa com os níveis de insulina. Esta avaliação é de grande importância, uma vez que os mecanismos envolvidos, habitualmente propostos, relacionam-se directamente com a presença de hiperinsulinémia (Lawlor et al., 2004). Por último, deve ser tido em linha de conta que se a relação observada entre a diabetes mellitus tipo II e o desenvolvimento cancerígeno da glândula mamária resultar principalmente da presença de hiperinsulinémia, poder-se-á esperar uma associação mais marcada em pacientes com um diagnóstico recente desta

doença, quando os níveis de insulina se encontram mais elevados (Lipscombe, Goodwin, Zinman, McLaughlin & Hux, 2006a).

Alguns estudos concluíram que existe uma associação positiva entre níveis elevados de péptido C, ou de insulina, e a manifestação de neoplasias mamárias malignas (Goodwin et al., 2008; Lawlor et al., 2004). Adicionalmente, a hipersinsulinémia pode também reflectir-se num prognóstico pior (DeCensi & Gennari, 2010). Segundo Irwin et al. (2011), um aumento na concentração do péptido C em 1ng/mL, aumenta o risco de morte em 31%, em que, 35% deste aumento deve-se ao desenvolvimento de tumores mamários. Esta observação vai de encontro aos estudos obtidos por Goodwin et al. (2002), nos quais mulheres com hiperinsulinémia, três meses após o diagnóstico de cancro mamário, manifestam um risco de morte três vezes superior.

Contudo, nem todas as pesquisas são concordantes. Numa análise prospectiva, realizada em participantes do estudo *Atherosclerosis Risk in the Community* (ARIC), não se conseguiu identificar nenhuma relação entre a concentração de insulina e o tumor mamário. Manifesta-se necessário a realização de novos estudos, não apenas para estabelecer se há uma associação consistente da hiperinsulinémia com o cancro mamário, mas também para determinar todos os mecanismos responsáveis por esta associação (Lawlor et al., 2004).

2.2.1.1 Acção directa através dos receptores de insulina

A insulina actua principalmente ao nível do tecido esquelético, muscular, adiposo e hepático. No entanto, existem células de diversos outros tecidos que também expressam receptores de insulina, como as células saudáveis e cancerígenas das glândulas mamárias.

Os receptores de insulina, de grande importância na activação da via Akt e da via MAPK, encontram-se expressos nas linhas celulares cancerígenas, e a sua sobreexpressão pode ser responsável por uma transformação maligna das células mamárias epiteliais. Este valor elevado de receptores pode resultar da estimulação pelas progestinas, da inactivação do gene supressor tumoral p53, ou da manifestação de diferentes oncogenes (Wolf & Rubinek, 2008). Segundo Wolf et al. (2006), o número de receptores de insulina nas células mamárias cancerígenas encontra-se aumentado, e a sua expressão está correlacionada com um pior prognóstico entre os doentes com neoplasia das glândulas mamárias. Papa et al. (1990) dosearam a quantidade de IR presente no tecido tumoral mamário e encontraram uma quantidade deste receptor seis vezes superior em relação ao mesmo tecido saudável. Também Novosyadlyy et al. (2010) concluíram que o bloqueio farmacológico dos receptores de insulina e de IGF-1, por moléculas inibidoras da tirosina cinase (BMS-536924), revertia o efeito promotor cancerígeno da diabetes mellitus.

2.2.1.1.1 Substratos dos receptores de insulina

As proteínas IRS integram os sinais produzidos pelos IR e têm um papel participativo no cancro mamário (Nagle, Ma, Byrne, White & Shaw, 2004). O IRS-1 e o IRS-2 podem encontrar-se, em grandes quantidades, nos diferentes tecidos mamários e nas linhas celulares cancerígenas destes (Xue & Michels, 2007). No entanto, estes dois receptores, segundo experiências realizadas em animais de laboratório, aparentam ter acções fisiológicas distintas (Nagle et al., 2004).

Considera-se que o IRS-1 possui um papel principal na activação do sistema de sinalização da insulina em células saudáveis, mas que em doentes com diabetes tipo II o seu número diminui, enquanto a quantidade de IRS-2 se mantém. Perante estas condições, os IRS-2 podem substituir o papel dos IRS-1 ao nível do tecido muscular e adiposo (Xue & Michels, 2007).

Actualmente, considera-se que o IRS-2, em particular, é um importante intermediário na activação do PI3K e que medeia a migração de células do carcinoma mamário. Segundo Nagle et al. (2004), a expressão e acção do IRS-2 não é necessária para a iniciação, para o crescimento tumoral nem para a sua progressão maligna, mas é requerida para a sua metastização. Especificamente, estes receptores favorecem a invasão dos tecidos pelas células mamárias tumorais e a resistência destas à apoptose induzida por stress. O facto das células tumorais que apenas apresentam IRS-2 serem mais invasivas e mais resistentes à apoptose propõe que tumores com esta característica serão mais agressivos.

Apesar das pesquisas realizadas sobre a apresentação de IRS no tumor mamário serem ainda poucas, segundo Schnarr et al. (2000), existe uma redução nos IRS-1 durante a progressão tumoral, assim como uma menor expressão nos cancros mamários pouco diferenciados. Assim, de acordo com esta análise, especula-se que os IRS-2 são os IRS predominantes nas últimas fases da progressão tumoral (Nagle et al., 2004).

2.2.1.2 Outras acções da insulina

Adicionalmente ao efeito directo da insulina nos seus receptores, a hiperinsulinémia pode influenciar o desenvolvimento de tumores mamários através de outros meios.

A insulina aumenta o número de receptores de GH no fígado e assim dá origem a um aumento da produção de IGF (Gallagher & LeRoith, 2010). Paralelamente, reduz a produção hepática de proteínas ligantes de IGF (IGFBP-1 e talvez IGFBP-2), o que origina um acréscimo dos níveis de IGF-1 livres em circulação. A IGF-1 tem uma maior acção mitogénica e anti-apoptótica que a insulina e estimula o crescimento das células neoplásicas e pré-neoplásicas, quando estas expressam receptores de IGF, de insulina e receptores híbridos (Giovannucci et al., 2010). Os valores elevados de insulina podem ainda influenciar o sistema IGF através da sua ligação directa aos receptores de IGF-1 (IGF-1R), com

consequente activação (Goodwin et al., 2008). Estes apresentam uma homogeneidade de aproximadamente 55% (Wolf & Rubinek, 2008) com os receptores de insulina, mas uma acção mitogénica e transformadora mais marcada (Vigneri et al., 2009).

Por fim, a insulina manifesta efeitos directos e indirectos ao nível dos estrogénios livres circulantes (Gallagher & LeRoith, 2010). O efeito indirecto da hiperinsulinémia na concentração das hormonas sexuais resulta da sua acção inibitória na síntese das globulinas ligantes destas, com consequente aumento das hormonas esteróides livres (Goodwin et al., 2008). Este efeito é mais notório nos níveis de estrogénio, uma vez que a testosterona compete pelas mesmas globulinas e apresenta uma maior afinidade com estas (Michels et al., 2003). Adicionalmente, a insulina tem a capacidade de estimular a actividade da aromatase, que promove um aumento nos valores de estradiol biodisponível, e de favorecer a síntese de estrogénios no estroma ovário e, possivelmente, nas glândulas adrenais (Lann & LeRoith, 2008) (Giovannucci et al., 2010). A insulina pode ainda elevar a expressão dos receptores de estrogénio nas células mamárias cancerígenas, e uma sinergia entre a insulina e o estradiol pode acelerar a proliferação destas células (Lann & LeRoith, 2008).

2.2.1.2.1 Hormonas sexuais

Algumas hormonas sexuais, em particular o estrogénio, apresentam um papel muito importante no crescimento e desenvolvimento da glândula mamária, estando também associadas à promoção e proliferação do tumor mamário. A sua acção é mediada por receptores de estrogénio intracelulares, os quais funcionam como reguladores de transcrição hormono-dependentes. Diversos estudos baseados na análise de uma associação entre hormonas esteróides endógenas e o risco de tumor mamário têm vindo a corroborar esta relação (Xue & Michels, 2007).

Segundo pesquisas realizadas a nível humano, considera-se que concentrações altas de estradiol e testosterona aumentam para dobro o risco cancerígeno do tecido da glândula mamária (*The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group*, 2010). Do mesmo modo, estudos epidemiológicos demonstraram uma associação positiva entre as concentrações de estrogénio e de testosterona e o desenvolvimento desta neoplasia, em mulheres na pré e pós-menopausa (Larsson, Mantzoros & Wolk, 2007).

Também, a participação das hormonas sexuais na manifestação de carcinomas mamários, ao nível dos principais espécies de animais domésticos, é corroborada pelos confirmados efeitos benéficos da ovariectomia e pelo aparecimento de neoplasias mamárias em gatos medicados com progestagénios (Millanta et al., 2005).

No entanto, a informação sobre a importância dos receptores de estrogénio na evolução da cancerinogénese mamária nas principais espécies domésticas é ainda escassa (Millanta et al., 2005). A nível dos felídeos domésticos, assim como dos canídeos, a manifestação dos

receptores de estrogénio é bastante maior em tecidos mamários normais do que nos locais de apresentação neoplásica (Millanta, Calandrella, Vannozzi & Poli, 2006; Toniti et al., 2009). Já o número de receptores de progesterona em gatos aumenta nos locais de alteração fibroadenomatosa e nos carcinomas “in situ” mas decresce nos carcinomas invasivos. Adicionalmente, os tumores sem receptores de estrogénio apresentam um pior prognóstico (Millanta et al., 2006).

Segundo Millanta et al. (2005), os carcinomas mamários felinos, quando são comparados com tumores do homem e tumores do cão, apresentam habitualmente os maiores índices de expressão negativa de receptores de estrogénio, o que pode significar uma possível independência à sua acção.

2.2.1.2.2 Sistema IGF

O sistema IGF tem sido considerado uma importante via reguladora do tumor mamário, o que tem aumentado o interesse do seu estudo no desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença (Wolf & Rubinek, 2008).

Segundo o “Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group” (2010), existe uma associação positiva significativa, entre as quantidades de IGF e o risco de tumor mamário. Um trabalho, realizado por Nunez et al. (2006), confirma o papel do IGF-1 e da GH na progressão tumoral. Segundo estes autores, os animais com uma deficiência nestes dois factores eram menos susceptíveis a desenvolver tumores, ao passo que, a suplementação destes animais com IGF e com GH aumentava o risco tumoral.

Adicionalmente, os próprios receptores de IGF-1 manifestam uma actividade oncológica descrita, bem conhecida (Yanochko & Eckhart, 2006). De acordo com Gallagher & LeRoith (2010), as mutações ao nível do p53, as quais podem ser observada nos tumores do cólon e da glândula mamária, provocam uma estimulação do IGF-1R.

Os IGF favorecem diversas respostas celulares, relacionadas com o seu crescimento, diferenciação e transformação, incluindo a síntese de ADN, ARN e proteínas celulares (Muti et al., 2002). Estes polipéptidos podem promover a evolução do ciclo celular e inibir a apoptose. Esta manifestação resulta da sua associação directa com outros factores de crescimento ou da sua relação indirecta com sistemas moleculares que apresentam uma acção cancerígena e promotora de crescimento, como as hormonas esteróides e as integrinas (Chaves & Saif, 2011).

A ligação do IGF-1 aos seus receptores, irá provocar, de modo indirecto, a activação de duas vias de sinalização, a MAPK e a PI3K. Enquanto a primeira via actua principalmente ao nível do crescimento e proliferação celular, a segunda possui maior responsabilidade nos efeitos metabólicos e anti-apoptóticos.

A via PI3K apresenta alguns intermediários que actuam na regulação da apoptose. A fosforilação da proteína cinaseB (Akt), que consequentemente transita para o núcleo celular, promove a fosforilação de factores de transcrição pró-apoptótica, e assim inibe a sua acção. A síntese proteica, necessária para o crescimento celular, aumenta na presença de glicose e aminoácidos e diminui na ausência de glicose. Este mecanismo é mediado pela proteína cinase mTOR (mammalian target of rapamycin). A IGF-1 contribui para o crescimento celular através da acção da Akt, que combate a supressão dos níveis de mTOR. De modo semelhante, e com o mesmo fim, a IGF inibe a expressão do p53, um gene supressor tumoral que pára o crescimento celular e estimula a apoptose.

Adicionalmente, o IGF-1 é também capaz de estimular os factores da angiogénese, que induzem a neovascularização, promovendo o crescimento e invasão tumoral (Gallagher & LeRoith, 2010).

Devido à possibilidade de diminuir o risco de tumores mamários através da redução das concentrações de IGF-1 circulantes, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para bloquear a acção cancerígena do sistema IGF-1 nos doentes oncológicos. Contudo, estes esforços podem resultar num efeito nefasto para o metabolismo glucídico, principalmente através de três factores: primeiramente, pela supressão da acção insulino-mimética do IGF-1; depois, pelo aumento da concentração de GH circulantes, resultante do sistema de retroalimentação negativo do IGF-1; e por último, pela possibilidade de uma inibição cruzada da via de sinalização da insulina (Vigneri et al., 2009).

Apesar de todas estas considerações, em 2009, um estudo caso-controlo não detectou qualquer tendência significativa na associação entre os valores de IGF-1 livre e a variação no risco de cancro mamário (Gunter et al., 2009).

2.2.1.2.2.1 Receptores híbridos insulina / IGF

O IR e o IGF-1R têm ainda a capacidade de formar um receptor híbrido que, assim como o IGF-1, apresenta uma afinidade maior para o IGF e menor para a insulina (Wolf & Rubinek, 2008).

O número de receptores híbridos encontra-se anormalmente aumentado nas células mamárias cancerígenas, assim como no tecido adiposo e no músculo esquelético de pacientes com diabetes mellitus tipo II (Xue & Michels, 2007). Contudo, Shimizu et al. (2004) defendem que a expressão aumentada de IGF-1R aumentada não pode ser correlacionada com o prognóstico desta doença, nem com o tamanho, grau histológico ou estado tumoral.

Assim, as IGF podem promover o crescimento de tumores mamários em diabéticos devido a uma expressão aumentada destes receptores híbridos (Xue & Michels, 2007). No entanto, habitualmente as concentrações sanguíneas da IGF-1, da IGF-2 e das suas proteínas ligantes (IGFBP) não se encontram aumentadas nos diabéticos tipo II, podendo mesmo estar diminuídas. Consequentemente, as IGF e as IGFBP podem não possuir uma grande

influência na associação entre a diabetes e o tumor mamário. Por isso, a participação do sistema IGF nesta relação deve-se, provavelmente, à activação da via de sinalização IGF-1 por elevados valores de insulina, que actua de modo cruzado não específico nos IGF-1R e nos receptores híbridos. Contudo, a influência destes mecanismos no desenvolvimento do tumor mamário ainda não é claro (Wolf & Rubinek, 2008) (Xue & Michels, 2007).

2.2.2 Hiperglicémia

De acordo com alguns estudos elaborados, os níveis altos de glicose em jejum apresentam um reflexo directo positivo no desenvolvimento de tumores mamários, em qualquer fase da vida reprodutiva. Considera-se ainda, mais especificamente, que valores de glicémia iguais ou superiores a 126 mg/dl, podem ser associados a um aumento no risco de carcinogénese mamária (Alokail et al., 2009; Erikson et al., 2010). Segundo Mink, Shahr, Rosamond, Alberg & Folsom (2002), foi observada uma associação positiva entre os níveis de glicose e o desenvolvimento cancerígeno, independente dos níveis de insulina. Contudo, os vários resultados díspares, obtidos noutros estudos, sugerem a necessidade de uma maior pesquisa nesta área (DeCensi & Gennari, 2010).

Muti et al. (2002), no seu estudo, defendem que as mulheres do seu estudo com os maiores valores de glicémia manifestam um risco 2,8 vezes superior de desenvolver tumores mamários do que as que apresentavam os valores mais baixos de glicémia. No entanto esta associação só se verifica, na fase pré-menopausa. Por sua vez, Satting et al (2007), encontraram uma associação significativa entre estes dois factores apenas em mulheres com menos de 49 anos. Contrariamente, Rapp et al.(2006), consideraram que esta relação era maior em mulheres com mais de 65 anos. Outros estudos ainda, não encontraram uma associação significativa entre os níveis de glicémia e o risco de tumor mamário (Kabat, et al., 2009).

Tem sido demonstrado em modelos vivos com diabetes tipo I uma diminuição no crescimento de diferentes tumores, o que sugere que não é a hiperglicémia que estimula o desenvolvimento tumoral. Vários dos estudos que estabelecem uma correlação entre a hiperglicémia e a carcinogénese não estabelecem se é a glicose o factor que actua a nível tumoral, ou se este parâmetro apenas mascara um factor causal como, por exemplo, a insulina. É de facto possível que alguns tipos de cancro sejam influenciados directamente pela hiperglicémia, através de uma promoção no crescimento, mas a informação até agora recolhida propõe a actuação dos receptores de insulina como o factor relacionado mais importante na tumorigénese (Giovannucci et al., 2010).

2.2.2.1 Mecanismos de acção da hiperglicémia nos tumores mamários

A possível correlação directa entre a glicose e o desenvolvimento de tumores mamários pode resultar do facto deste monossacárido ter a capacidade de promover a selecção de clones celulares malignos. Este facto é provavelmente devido a que, as células neoplásicas utilizam grandes quantidades de glicose no seu desenvolvimento. Para mais, uma das características principais dos tecidos malignos é o aumento do metabolismo glucídico pela via pentose-fosfatase (Multi et al., 2002). Ou seja, valores de glicémia aumentados favorecem a carcinogénese, porque criam um ambiente propício ao seu crescimento (Xue & Michels, 2007).

Actualmente, tem ressurgido o interesse na hipótese de Warburg (1956), que defende que as células cancerígenas apresentam como via preferencial na obtenção de energia a glicólise, e não a fosforilação oxidativa. Por isso, segundo esta teoria, as células tumorais necessitam de quantidades muito superiores de glicose do que as células normais, que utilizam a via oxidativa, para a produção do mesmo número de ATP's.

A preferência destas células pela glicólise, uma via mais simples com menor produção de energia, pode parecer pouco óbvia. Contudo, a razão para a escolha desta via pode ser a ampla necessidade de substratos moleculares, requeridos, exemplificativamente, na síntese membranar. Estes apenas podem ser obtidos por esta via e não pela via da fosforilação oxidativa. De modo compensatório, embora as células neoplásicas produzam menos energia por molécula de glicose, o que aumenta muito as suas necessidades glucídicas, estas apresentam uma enorme capacidade de transportar glicose para o seu interior. Este princípio é, aliás, a base para a utilização da tomografia por emissão de positrões na detecção de tumores, técnica que identifica tecidos com altas concentrações de glicose (Giovannucci et al., 2010; Poliak, 2009).

De acordo com esta hipótese, as células cancerígenas, de crescimentos rápido, produzem grandes quantidades de piruvato através da glicólise, que é reduzido em lactato e posteriormente libertado. Como consequência, obtemos um ambiente local relativamente ácido, que pode ter implicações na terapêutica tumoral. O lactato resultante pode ser utilizado na gliconeogénese hepática, um processo que consome energia e que causa um hipermetabolismo responsável pela caquexia paraneoplásica (Bender & Mayes, 2006b).

Para além de proporcionar um ambiente favorável, a própria glicose pode apresentar uma acção directa nos processos cancerígenos, pela produção de radicais livres e pela indução de uma destruição oxidativa do ADN e das enzimas responsáveis pela reparação e processamento do ADN (Multi et al., 2002).

Existem ainda outros mecanismos apontados, possivelmente envolvidos nesta associação, como por exemplo: o papel de um balanço energético anormal e o efeito prejudicial da

hiperglicémia na acção do ácido ascórbico no metabolismo intracelular; a diminuição da capacidade efectiva do sistema imunitário (Vigneri et al., 2009).

2.3 POSSÍVEL INFLUÊNCIA DA TERAPÊUTICA DE DIABETES EM TUMORES MAMÁRIOS

Um dos parâmetros principais no tratamento de diabetes tipo II é a administração de fármacos capazes de reduzir os valores de glicémia. O efeito destes no desenvolvimento tumoral não é ainda claro. A maioria dos estudos é inconclusiva, uma vez que uma grande parte destes doentes sofre alterações medicamentosas, tanto no tipo como na dosagem, com decorrer da doença. Para mais, as diferentes famílias de anti-diabéticos apresentam mecanismos de acção alternativos (Vigneri et al., 2009).

Uma terapêutica com análogos de insulina, ou com sulfonilureias, que resulta numa elevação dos níveis de insulina circulante, provavelmente estará associada a um aumento no risco cancerígeno. Por sua vez, a administração de metformina, uma biguanida que não só aumenta a sensibilidade periférica à insulina como reduz a produção de glicose hepática, ou de tiazolina, pode promover uma diminuição deste risco (Mussig, 2010).

Estas considerações são de alguma relevância quando se tenta estabelecer uma relação directa entre as alterações do metabolismo glucídico e o desenvolvimento de tumores mamários, podendo influenciar os resultados obtidos.

2.3.1 Agentes orais hipoglicémicos

Em gatos domésticos diabéticos, mais de 30% manifesta um bom controlo da doença apenas com recurso aos agentes orais hipoglicémicos, embora esta percentagem varie conforme a população-alvo e o momento do seu diagnóstico (Rand & Marshall, 2005).

Dentro dos agentes orais hipoglicémicos podemos dividi-los em três principais famílias: as sulfonilureias, as biguanidas e as tiazolinas. As sulfonilureias estimulam a secreção endógena de insulina, enquanto as biguanidas e as tiazolinas são insulino-sensibilizadoras. Considerando a possível importância da insulina no aumento do risco cancerígeno mamário, será expectável que estes fármacos possuam algum efeito a nível tumoral (Vigneri et al., 2009).

2.3.1.1 Sulfonilureias

As sulfonilureias são aplicadas há mais de 50 anos, a nível humano, em pacientes com diabetes mellitus tipo II, sendo muito eficiente no decréscimo da concentração de HbA1c. Existe actualmente um pequeno número de estudos que registam um aumento do risco e da

mortalidade cancerígena em doentes diabéticos tratados com sulfonilureias, comparativamente com outros medicamentos, como a metformina. Contudo, embora esta associação possa ser real, não é possível perceber se as observações apresentadas nestes estudos resultam de um aumento no risco tumoral em doentes tratados com secretagogos, ou se de uma redução naquelas que recorrem a outros fármacos.

Adicionalmente, será também importante determinar se esta relação é promovida por efeitos directos destes agentes nas células, ou por efeitos indirectos, como o verificado aumento dos níveis de insulina (Giovannucci et al., 2010).

A glipizida é o fármaco desta classe mais usado em gatos, muito embora só deva ser aplicado naqueles que apresentam uma boa condição corporal, sinais ligeiros ou moderados e sem corpos cetónicos. Como esta sulfonilureia não manifesta grandes vantagens em relação à insulina e é apenas eficiente em 30% dos casos, só deve ser usado quando os donos não têm capacidade para administrar o injectável. Além disso, actualmente, este fármaco já não é usado em vários países (Reusch, 2010).

2.3.1.2 Biguanida metformina

A metformina é uma das terapêuticas a que mais se recorre no tratamento de diabetes tipo II em humanos, sendo utilizada tanto numa fase inicial como num tratamento combinado. A sua acção reduz as concentrações de glicose e insulina circulantes, quando há uma manifesta insulino-resistência e consequente hiperinsulinémia. Contudo, o seu mecanismo de acção ainda não é completamente conhecido (Giovannucci et al., 2010). Segundo o que se sabe, em neoplasias mamárias, este fármaco inibe a proliferação, a invasão e a angiogénese das células neoplásicas, para além de aumentar a sensibilidade destas à quimioterapia e ao tratamento tumoral. A nível da glândula mamária, este fármaco, em sinergia com a quimioterapia, reduz o desenvolvimento tumoral e aumenta o tempo de sobrevivência dos animais oncológicos (Wysocki & Wierusz-Wysocka, 2010).

A sua influência anti-cancerígena resulta da consequente redução nos valores de insulina circulante mas também da activação do AMPK (proteína cinase activada por adenosina monofosfato). A AMPK, que manifesta um acréscimo em estados de hipoglicémia, inibe o mTOR, reduzindo a síntese proteica. Adicionalmente, a AMPK activada suprime a gliconeogénese, a síntese de ácidos gordos e colesterol, e estimula a glicólise e a oxidação dos ácidos gordos. Este fármaco também activa a AMPK ao nível das células cancerígenas, diminuindo o seu crescimento.

Um estudo realizado em doentes com tumores mamários demonstrou que aqueles que tomavam metformina apresentavam uma probabilidade maior de ter uma resposta completa à quimioterapia neoadjuvante, comparativamente com os pacientes diabéticos a quem não era administrado este fármaco (Jiralerspong et al., 2009). Outro estudo defende que

pacientes diabéticos medicados do mesmo modo têm um risco neoplásico de 0,63 relativamente àqueles que não o tomam (Libby & et al., 2009).

Algumas pesquisas *in vitro* têm proposto que a metformina pode destruir selectivamente as células estaminais cancerígenas e tornar os tratamentos tumorais mais efectivos (Giovannucci et al., 2010).

Contudo, a aplicação deste fármaco em gatos diabéticos não têm tido muito sucesso, principalmente quando é usado isoladamente, não sendo por isso um fármaco de escolha actualmente nestes animais. Até agora apenas existe um estudo realizado sobre a sua aplicação nesta espécie e o seu resultado não foi encorajador (Rand & Marshall, 2005; Reusch, 2010).

2.3.1.3 Tiazolinas

As tiazolidinas são agonistas dos receptores activados da proliferação de peroxissomas (**PPAR**) e não causam um acréscimo directo de insulina nem resultam numa hipoglicémia, quando usadas isoladamente. Segundo pesquisas *in vitro*, esta classe farmacológica também tem acção anti-cancerígena, resultante da sua capacidade de inibição do crescimento celular, de indução da apoptose e da diferenciação celular, tendo sido ponderada a sua aplicação na terapêutica cancerígena. Contrariamente, a sua capacidade de potenciar a cancerinogénese tem sido proposta em estudos realizados em animais de laboratório. Assim, a sua influência no desenvolvimento cancerígeno pode ser positiva, negativa ou nula (Giovannucci et al., 2010).

Porém o uso isolado deste medicamento no tratamento de gatos diabéticos têm pouca utilidade (Rand & Marshall, 2005) e a sua capacidade de actuação nesta espécie é pouco conhecida. Quando é aplicada a gatos saudáveis obesos, este fármaco promove a diminuição dos valores de colesterol, triglicéridos e leptina, e dá origem a uma diminuição dos ácidos gordos não saturados (non-esterified fatty acids, NEFAs), da glicose e da insulina em testes de tolerância à glicose (Reusch, 2010).

2.3.2 Análogos de insulina

Os análogos de insulina podem manifestar efeitos mitogénicos alterados, diferentes dos resultantes da insulina endógena, fruto da sua estrutura manipulada (Mussig et al., 2010).

A sua associação com diferentes tipos de cancro dever-se-á, provavelmente, mais a uma acção mitogénica do que cancerígena, promovendo um maior crescimento de um tumor pré-existente. Este efeito tem sido observado com maior prevalência em cancros prostáticos, pancreáticos, colorrectais e da glândula mamária (Call et al., 2010).

A realização de estudos *in vitro* com a glargina, um análogo da insulina de acção longa, tem tido resultados controversos, uma vez que tem registado efeitos mitóticos não confirmados *in vivo*. As informações até agora recolhidas não nos dão uma resposta conclusiva, o que sugere a necessidade de futuras pesquisas sobre a sua associação com o aumento do risco tumoral (Müssig et al., 2010).

A forma como os análogos de insulina influenciam o desenvolvimento tumoral resulta de acções directas e indirectas. Os seus efeitos directos são promovidos pela sua interacção com as células cancerígenas, transformadas ou em risco de transformação. Trabalhos anteriormente elaborados defendem que a glargina apresenta uma afinidade muito maior com os receptores de IGF-1 e uma capacidade mitogénica superior do que a insulina endógena e do que outros análogos. As suas manifestações indirectas, menos estudadas, incluem a acção de moléculas de sinalização, como a glucagina ou a adiponectina, cuja quantidade e actividade é influenciada pelos análogos de insulina (Giovannucci et al., 2010). Contudo, a acção da glargina em gatos domésticos tem apresentado resultados bastante positivos na resolução da diabetes mellitus, com melhor controlo glicémico e com maiores índices de remissão do que insulina de acção lenta (Rand & Marshall, 2005). Além disso, a nível humano, considera-se que a sua acção benéfica na redução da morbilidade e mortalidade diabética compensa os possíveis riscos da sua utilização (Call et al., 2010).

2.4 POSSIBILIDADE DE UMA ASSOCIAÇÃO INVERSA

A possibilidade de uma associação inversa, em que o desenvolvimento de diabetes mellitus tem origem numa pré-manifestação tumoral ou nos consequentes tratamentos aplicados, tem sido até agora pouco investigada. Com efeito, não existem ainda estudos que analisem o risco de diabetes mellitus em pacientes com neoplasia da glândula mamária. No entanto, esta hipótese foi colocada por Lipscombe et al. (2006b), quando estudou, pela primeira vez, a prevalência de tumores mamários em doentes pré-diabéticos.

O aumento de peso, provavelmente associado à quimioterapia adjuvante do tumor mamário, entre outras causas, aumenta o risco de diabetes mellitus. Contudo, a relevância deste factor requer mais pesquisa.

Adicionalmente, os fármacos usados no tratamento anti-cancerígeno podem promover o desenvolvimento de diabetes mellitus, ou piorar um quadro pré-existente, através dos seus efeitos adversos no metabolismo glucídico. A presença de estados de hiperglicémia, ou de diabetes mellitus declarada, podem manifestar-se nestes doentes por administração de glicocorticóides, ou por mecanismos mais específicos resultante deste tipo de terapêutica.

A utilização de anti-estrogénios também causa efeitos adversos no metabolismo glucídico, diminuindo a sensibilidade à insulina e alterando o perfil lipídico (Vigneri et al., 2009). A utilização de tamoxifeno, um fármaco anti-estrogénio não esteróide muito usado no

tratamento de tumores mamários, promove um quadro de hipertrigliceridémia e de esteatose hepática, que se traduz numa insulino-resistência (Lipscombe et al., 2006b).

Por fim, o desenvolvimento de tratamentos anticancerígenos que promovem alterações ao nível da IGF-1 e da sua via intracelular, pode também contribuir para o aumento de casos de diabetes relacionadas com a terapêutica oncológica.

A evidência de uma complexa associação directa entre a diabetes mellitus e os tumores mamários, assim como a possibilidade de uma relação inversa, suporta a necessidade de um maior cuidado clínico e de mais estudos sobre este tema (Vigneri et al., 2009).

3. TRABALHO EXPERIMENTAL

A elaboração deste estudo foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL). Os animais considerados neste trabalho e que compõem a nossa amostra foram obtidos através do Hospital desta Faculdade ou através da Liga Protectora dos Animais (LPDA), entre o dia 30 de Setembro de 2010 e o dia 28 de Junho de 2011.

3.1. OBJECTIVOS DO ESTUDO

Com base nos dados experimentais e epidemiológicos existentes actualmente, considera-se cada vez mais provável que a glicose e a insulina circulantes favoreçam a carcinogénese mamária. Contudo, poucos são os estudos, a nível humano que analisam uma associação entre a concentração sanguínea destes dois parâmetros e o risco de desenvolver tumores mamários (Kabat et al., 2009). Trabalhos experimentais sobre a presença desta relação, em animais domésticos, são inexistentes ou do nosso desconhecimento.

Assim, o objectivo principal deste estudo foi avaliar a possibilidade de uma associação directa significativa entre as variações de parâmetros específicos do metabolismo glucídico e o risco de tumorigénese mamária em gatos domésticos. Concretamente, pesquisou-se a incidência de valores aumentados de glicose, de frutamina e de insulina no sangue, em animais com diagnóstico prévio de carcinoma mamário.

Procurou-se também estabelecer uma relação entre as concentrações sanguíneas de glicose, de frutamina e de insulina, e a gravidade do tumor, com base na sua classificação clínica, no seu tamanho e no seu grau de malignidade.

Por fim, considerou-se ainda a possibilidade de uma associação inversa, em que a presença de massas neoplásicas provocaria alterações a nível do metabolismo glucídico.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Animais

Os animais incluídos neste estudo foram dez gatos, fêmeas inteiras ou castradas, com idades compreendidas entre os 7 e os 14 anos, 2 persas e 8 gatas domésticas de pêlo curto, com diagnóstico presuntivo e posteriormente confirmado de carcinoma mamário e sem doenças concomitantes. Seis casos foram presentes à consulta e a posterior cirurgia no Hospital da FMV-UTL, onde se recolheram as informações e amostras biológicas necessárias. Os outros 4 casos foram submetidos a procedimento cirúrgico na LPDA, onde se obtiveram as informações possíveis e as amostras necessárias.

3.2.2. Critérios de exclusão

Todos os animais com doenças concomitantes confirmadas ou que apresentavam suspeitas disso foram eliminados deste estudo. Também todos aqueles que tinham sido recentemente medicados foram excluídos.

3.2.3. Anamnese

Através da consulta da história pregressa, foram recolhidas as principais informações do animal, necessárias para a elaboração deste estudo. Deste modo, foi possível registar a sua idade, a sua raça, a anterior realização, ou não, de ovariectomia e a possível administração prévia de fármacos. Pudemos ainda confirmar a ausência de doenças concomitantes.

3.2.4 Exame físico

Através do exame físico procurámos confirmar o bom estado geral do animal.

3.2.5 Hemograma e análises bioquímicas

Como procedimento pré-cirúrgico corrente, realizou-se um hemograma e a análise de diversos parâmetros bioquímicos sanguíneos gerais, que ficaram ao encargo dos donos.

Aquando da marcação da cirurgia, colheu-se sangue da veia cefálica ou da veia jugular do animal, para um tubo de EDTA e para um tubo de Heparina. Os parâmetros bioquímicos medidos foram a alanina aminotransferase (ALT), a fosfatase alcalina sérica (FAS), a bilirrubina total, a albumina, as proteínas totais (PT), a ureia, a creatinina e a glicose. As amostras de sangue foram processadas no Laboratório Prof. M. Braço Forte da FMV-UTL.

3.2.6 Exame radiográfico torácico

As radiografias torácicas foram realizadas no Hospital da FMV-UTL com recurso a um aparelho radiográfico Pactrix 300 Philips. Para um bom exame radiográfico, executou-se uma incidência latero-lateral direita, uma incidência latero-lateral esquerda e uma incidência ventrodorsal.

3.2.7 Estadiamento clínico do tumor

O estadiamento dos tumores mamários foi realizado através da classificação “TNM – Classificação dos tumores em animais domésticos”, elaborado pela World Health Organization (Owen, 1980). Assim, avaliou-se a dimensão do tumor primário (T), os linfonodos locais e regionais (N) e o possível desenvolvimento de metástases noutras regiões (M). Do somatório destes 3 parâmetros, e segundo esta classificação, determinámos o estadiamento clínico, que varia entre I e IV (Tabela 1).

Tabela 1. Estadiamento clínico do tumor mamário maligno em gatos, modificado de Owen 1980.

T: Tamanho do tumor mamário					
T1	< 1 cm de diâmetro	Estadios clínicos			
T2	1 a 3 cm de diâmetro	I	T1	N0	M0
T3	> 3 cm de diâmetro	II	T0-1	N1	M0
T4	carcinoma inflamatório		T2	N0,1,2	M0
N: Linfonodos regionais		III	T3	N0,1,2	M0
N0	sem metástases		T1,2,3	N2	M0
N1	metástases no linfonodo ipsilateral	IV	T1,2,3	N0,1,2	M1
N2	metástases no linfonodo contralateral		T4	N0,1,2	M0,1
M: Metástases					
M0	sem metástases				
M1	com metástases				

3.2.8 Exame histopatológico

Todas as massas extirpadas com diagnóstico presuntivo de tumor mamário foram enviadas para o Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UTL, para análise histopatológica.

Para isso, em cirurgia, a cadeia mamária afectada foi colhida com uma margem de segurança de 1 a 3 cm. Os linfonodos retromamários foram também analisados, sendo removidos com a glândula mamário número 4. Já os linfonodos axilares apenas foram extirpados quando se encontravam alterados (Figura 7 e 8).

A amostra foi colocada em frascos adequados, com formol a 10%, numa proporção de 1/10, para que ocorresse a sua correcta fixação. Posteriormente, esta foi desidratada por imersão sequencial em etanol de concentrações crescentes 70°, 80°, 90° e 100°. Seguidamente, para a sua inclusão, a amostra foi mergulhada em xilol e depois em parafina líquida. Ao bloco resultante foram realizados cortes com 3 µm de espessura, com um micrótomo Leica SM 2000R. Os cortes foram corados pelo método hematoxilina-eritrosina e montados com Entellan®. Para observação das lâminas utilizou-se um microscópio óptico.

Figura 7. Apresentação de tumores mamários antes da intervenção cirúrgica.

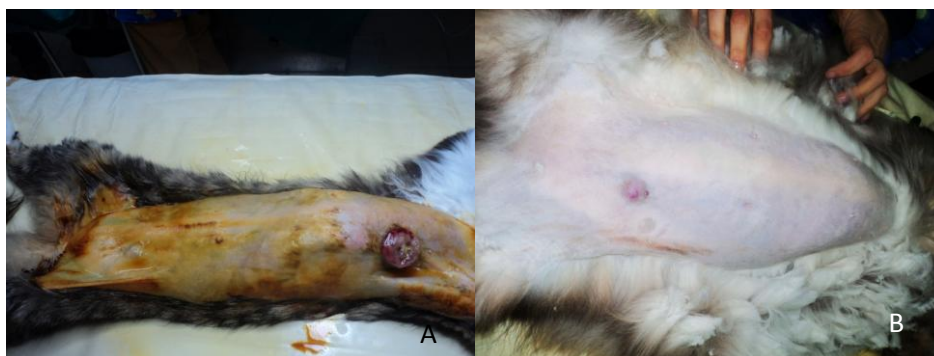


Figura 8. Peça com massas tumorais extirpada, enviada para análise histopatológica.



O grau de malignidade histopatológica do tumor foi obtido através da classificação I, II e III, respectivamente denominado de malignidade fraca, moderada ou elevada, segundo os critérios histológicos adaptados de Scarff e Bloom (1977). O grau de diferenciação, a presença de anaplasia e o número de mitoses são os parâmetros observados para a classificação.

3.2.9 Medição de glicémia

O doseamento da glicose sanguínea foi realizado em três tempos:

T1 - Primeira medição de glicémia, realizada aquando da colheita de sangue para as análises pré-cirúrgicas.

T2 - Segunda medição, em 7 dos 10 casos estudados, feita 10 dias depois da cirurgia, quando o animal voltava para remoção dos pontos.

T3 – Segunda medição, nos 3 casos restantes, realizada aproximadamente um mês depois, antes da primeira sessão de quimioterapia.

Para a sua medição foi sempre utilizado o glucómetro do Hospital da FMV-UTL, “OneTouch® UltraMini®”. Os resultados são apresentados em mg/dL (Figura 9).

Figura 9. Glucómetro “OneTouch® UltraMini®” e tiras utilizados no estudo.



3.2.10 Medição de frutossamina e insulina

A obtenção de amostras, para posterior doseamento de frutossamina e insulina sanguínea, foi realizado em três tempos:

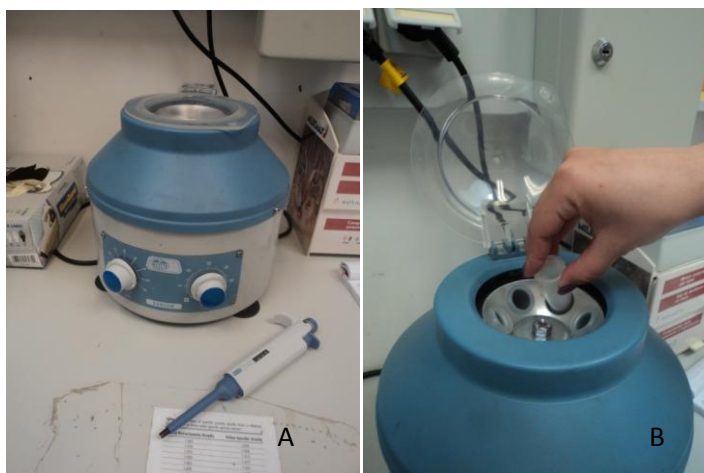
T1 – Correspondente à primeira medição, realizada aquando da colheita de sangue para as análises pré-cirúrgicas.

T2 – Correspondente à segunda medição, em 7 dos 10 casos estudados, feita 10 dias depois da cirurgia, quando o animal voltava para remoção dos pontos.

T3 – Correspondente à segunda medição, nos 3 casos restantes, realizada aproximadamente um mês depois, antes da primeira sessão de quimioterapia.

Após a colheita, a amostra foi centrifugada durante 10 minutos, a 2000 g (força-g), na centrífugadora do Hospital da FMV-UTL (Figura 10). Seguidamente, retirou-se o soro para dois tubos *ependorfs*, com o auxílio de uma micropipeta e, de imediato, congelou-se as amostras a -20 ° C.

Figura 10. Centrífuga do Hospital da FMV-UTL, utilizada na elaboração do estudo.



A medição de frutossamina foi realizada no Laboratório Joaquim Chaves, por técnica colométrica com coloração nitroazul de tetrazólio. Os resultados são apresentados em $\mu\text{mol/L}$.

A medição da insulina foi realizada no Laboratório de Endocrinologia da FMV-UTL, através do teste IMMULITE/IMMULITE 1000 Insulin, ensaio imunométrico por quimioluminescência com a enzima marcada em fase sólida. Os resultados são apresentados em $\mu\text{UI/ml}$.

3.2.11 Análise Estatística

Para a elaboração da análise estatística descritiva dos resultados foi utilizado o programa de estatística SPSS statistics17.0 (IBM Inc.).

Através deste programa investigou-se também a existência de correlações lineares simples entre as diferentes variáveis consideradas (Tabela 2), por determinação de coeficientes de correlação de Pearson (r) significativos.

Tabela 2. Correlações de Pearson pesquisadas no estudo.

Glicémia pré-cirúrgica	Classificação clínica TNM
	Dimensão do tumor
	Classificação histopatológica
Glicémia pós-cirúrgica	Classificação clínica TNM
	Dimensão do tumor
	Classificação histopatológica
Frutossamina pré-cirúrgica	Classificação clínica TNM
	Dimensão do tumor
	Classificação histopatológica
Frutossamina pós-cirúrgica	Classificação clínica TNM
	Dimensão do tumor
	Classificação histopatológica

Foram ainda realizados testes t -Student para amostras emparelhadas, entre os valores de glicémia pré e pós-cirúrgica e entre os valores de frutossamina pré e pós-cirúrgica. Estes testes foram aplicados tanto na população total ($N=10$), como na população parcial ($N=7$) que realizou a segunda colheita em T2.

O nível de significância estatística considerado foi $p < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Anamnese e exame físico

Com base na anamnese podemos concluir que a idade dos animais do grupo amostra varia entre os 7 e os 14 anos, e a sua média encontra-se nos 10,6 anos (Tabela 3). Em todos os animais observou-se uma boa condição de estado geral e registou-se uma condição corporal normal e a ausência de doenças concomitantes. Das dez gatas que compõem este estudo apenas duas tinham sido submetidas a uma ovariectomia (Meggy, caso 1; Nuska, caso 4).

Tabela 3. Idade do grupo amostra (N=10).

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Idade (anos)	10	7	14	10,60	2,01

3.3.2. Hemograma e análises bioquímicas

Os resultados do hemograma e das análises bioquímicas pedidas encontravam-se dentro da normalidade, em todos os casos considerados.

3.3.3. Exame radiográfico

Com base no exame radiográfico torácico foram detectadas metástases pulmonares em 2 dos 10 casos estudados. Nos restantes casos não foi observada qualquer alteração radiológica a este nível.

3.3.4. Estadiamento clínico do tumor

Após estadiamento clínico dos tumores, de acordo com o sistema “TNM”, observou-se que em 5 / 10 casos os tumores encontravam-se em estadio II, 3/10 foram classificados em estadio III e 2/10 em estadio IV (Tabela 4).

Tabela 4 Distribuição dos casos quanto à Classificação clínica – TNM (N=10).

	N	Percentagem (%)	Percentagem Cumulativa
Estadio 2	5	50,00	50,00
Estadio 3	3	30,00	80,00
Estadio 4	2	20,00	100,00
Total	10	100,00	

3.3.4.1 Dimensão do tumor

A dimensão dos tumores primários da nossa amostra variava entre 1,5 cm e 10 cm, com uma média de 4,55 cm (Tabela 5). Apenas dois dos tumores mediam 2 cm, ou menos e os restantes 8 casos apresentavam dimensões iguais ou superiores a 3 cm.

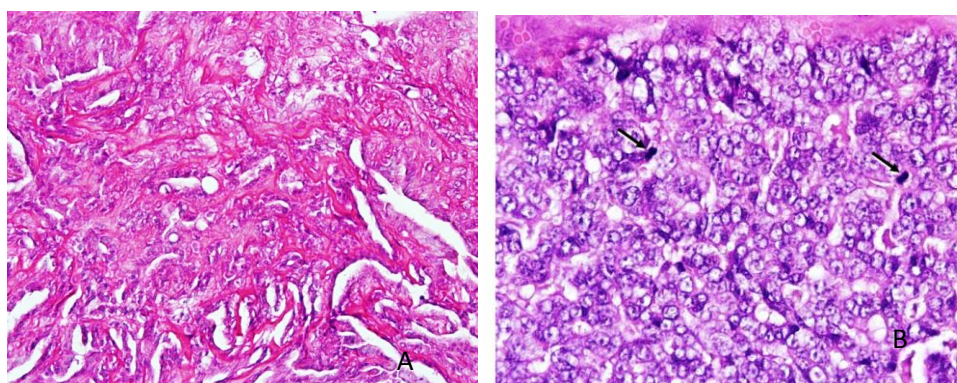
Tabela 5. Dimensão dos tumores do grupo amostra (N=10).

Dimensão do Tumor (cm)	
N	10
Média	4,55
Desvio Padrão	2,61
Mínimo	1,50
Máximo	10,00

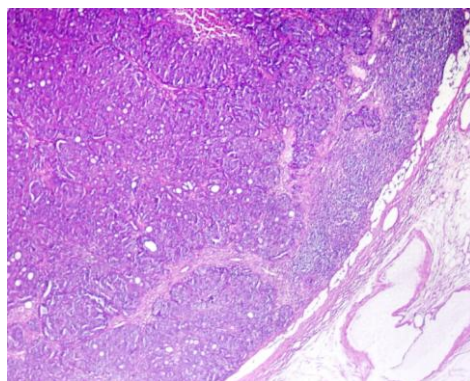
3.3.5. Exame histopatológico

Após o exame histopatológico das massas extirpadas, observou-se que 8 dos casos analisados apresentavam um grau de malignidade elevada (III), 1 caso apresentava um grau de malignidade moderada (II) e 1 caso apresentava apenas um grau de malignidade fraca (I) (Figura 11). Dois dos casos classificados com malignidade elevada apresentavam já extensas lesões de metástase do carcinoma mamário ao nível dos linfonodos (Figura 12). Os carcinomas analisados foram descritos como cribiformes, tubulares, papilíferos, túbulo-papilíferos ou escamosos (espino-celulares).

Figura 11. Cortes histológicos de carcinomas mamários de amostras colhidas durante o estudo (original).



Legenda: A - Carcinoma mamário túbulo-papilífero de grau II de malignidade. 200X, H&E;
B – Carcinoma mamário tipo tubular de grau III de malignidade. Mitoses (setas). 400X, H&E.

Figura 12. Metástase de carcinoma mamário num linfonodo (original).

Legenda: Metástase, num linfonodo regional, de carcinoma mamário cribriforme de grau III de malignidade. 40 X, H&E.

3.3.6. Medição de glicémia

O valor mínimo de glicémia na fase pré-cirúrgica foi de 72 mg/dL, o valor máximo foi de 177 mg/dL, e a média dos 10 casos foi de 127,2 mg/dL. As colheitas realizadas no período posterior à cirurgia apresentaram um valor mínimo de glicémia de 67 mg/dL, um valor máximo de 224 mg/dL com uma média de 120,3 mg/dL (Tabela 6).

Tabela 6. Níveis de glicémia do grupo amostra (N=10).

	Glicémia pré-cirúrgica (mg/dL)	Glicémia pós-cirúrgica (mg/dL)
N	10	10
Mínimo	72	67
Máximo	177	224
Média	127,20	120,30
Desvio Padrão	38,50	50,61

Das 10 amostras colhidas pré-cirurgicamente, 7 delas apresentavam um valor de glicémia compreendido dentro do intervalo de referência (60-171 mg/dL). Os outros 3 casos apresentavam um valor no limite máximo, ou superior ao normal: Nina, caso 4 (173 mg/dL); Nuska, caso 5 (171 mg/dL); Tareca, caso 8 (177 mg/dL).

No que diz respeito aos valores de glicémia obtidos, das 10 amostras colhidas posteriormente à cirurgia, 8 encontravam-se dentro do intervalo de referência. As restantes 2 amostras apresentavam um valor superior ao normal: Sol, caso 2 (186 mg/dL) e Mia, caso 3 (224 mg/dL) (Anexo1).

Se considerarmos apenas o tempo T2, é possível observar que em todos os animais o valor de glicémia obtido pós-cirurgicamente é inferior ao valor de glicémia obtido pré-cirurgicamente, excepto no caso da Meggy e da Nucha (caso1 e 7) (Tabela 7).

Tabela 7. Níveis de glicémia em T1 e T2 nos 7 animais considerados (N=7).

	Média	N	Desvio Padrão
Glicémia pré-cirúrgica (mg/dL)	134,00	7	43,04
Glicémia pós-cirúrgica (mg/dL)	103,14	7	24,11

Os valores de glicémia pós-cirúrgicos apresentaram uma correlação negativa moderada significativa ($r(8) = -0,69$; $p = 0,03$) com a dimensão dos tumores primários (Tabela 8).

Todas as outras correlações analisadas, com base nos valores de glicémia, foram consideradas não significativas (Anexo 2).

Tabela 8. Correlação entre a glicémia pós-cirúrgica e a dimensão do tumor

		Dimensão do tumor
Glicémia pós-cirúrgica	Correlação de Pearson	-,69
	P	,03
	N	10

Os teste t-Student para amostras emparelhadas, realizados para os níveis de glicémia pré e pós-cirúrgicos, foram considerados não significativos ($p > 0,05$) (Anexo 4, Tabela 1 e 2).

3.3.7. Doseamento de frutossamina

Dentro das 10 amostras colhidas pré-cirurgicamente, o valor mínimo de frutossamina registado foi 143 $\mu\text{mol/L}$, o valor máximo foi 316 $\mu\text{mol/L}$ e a média obtida foi 219,60 $\mu\text{mol/L}$. Nas 10 amostras obtidas após a extirpação do tumor, registou-se um valor mínimo de frutossamina de 158 $\mu\text{mol/L}$, um valor máximo de 415 $\mu\text{mol/L}$ e uma média total de 229,9 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 9).

Tabela 9. Níveis de frutossamina do grupo amostra (N=10).

	Frutossamina pré-cirúrgica ($\mu\text{mol/L}$)	Frutossamina pós-cirúrgica ($\mu\text{mol/L}$)
N	10	10
Mínimo	143	158
Máximo	316	415
Média	219,60	229,90
Desvio Padrão	49,58	72,38

Com base nos 20 resultados obtidos, foi possível observar que 19 amostras apresentavam valores de frutossamina dentro do intervalo de referência (100-400 µmol/l), e apenas uma registou um valor ligeiramente aumentado, 415 µmol/l. Esta última amostra pertencia à Nuska, caso 5, e foi obtida em T2 (Anexo 1)

Quando analisamos apenas os animais considerados no tempo T2 (N=7), constatamos que o valor de frutossamina é sempre superior, em cada animal, na amostra pós-cirúrgica, excepto no caso da Nucha (caso 7) (Tabela 10).

Tabela 10. Níveis de frutossamina do sub-grupo “2ª colheita 10 dias após a cirurgia” (N=7).

	Média	N	Desvio Padrão
Frutossamina em T1 (µmol/L)	207,86	7	42,83
Frutossamina em T2 (µmol/L)	249,57	7	78,59

Os valores de frutossamina pré-cirúrgicos apresentaram uma correlação positiva moderada significativa ($r(8) = 0,65$; $p = 0,04$) com o grau de malignidade do tumor (Tabela 11).

Todas as outras correlações analisadas, com base nos valores de frutossamina, foram consideradas não significativas (Anexo 3).

Tabela 11. Correlação entre os níveis de frutossamina pré-cirúrgica e o grau de malignidade.

	Grau de malignidade	
Frutossamina pré-cirúrgica	Correlação de Pearson	,65
	p	,04
	N	10

Os testes t-Student para amostras emparelhadas, baseados nos valores de frutossamina, foram considerados não significativos ($p > 0,05$) (Anexo 4, Tabela 3). Contudo, o teste t-Student realizado para os valores de frutossamina de T1 e T2, nos 7 animais considerados, apresentou um valor de significância (p) muito próximo de 0,05 ($p = 0,054$). A estatística deste teste foi $t(6) = -1,89$, o que reflecte um aumento nos valores de frutossamina das amostras pré-cirúrgicas para as amostras pós-cirúrgicas (Tabela 12).

Tabela 12. Teste t-Student para amostras emparelhadas entre os valores de frutossamina das duas colheitas

	t	Graus de liberdade	Significância
Frutossamina em T1 e T2	-1,890	6	0,054

3.3.8 Doseamento de insulina

Após o processamento das 10 amostras de soro colhidas em T1, para determinação dos valores de insulina, observou-se que todos os animais apresentavam uma quantidade de insulina inferior a 2 $\mu\text{UI/mL}$, excepto a Nucha (caso 7), que apresentou uma concentração de 20,8 $\mu\text{UI/mL}$.

Quanto aos níveis de insulina medidos em T2, todas as amostras apresentavam valores inferiores a 2 $\mu\text{UI/mL}$, excepto a amostra da Nucha (caso 7), que registou um valor de 10,6 $\mu\text{UI/mL}$.

Todos os valores medidos em T3 também manifestaram valores inferiores a 2 $\mu\text{UI/mL}$ (Anexo 1).

3.4 DISCUSSÃO

Até ao momento presente, segundo o nosso conhecimento, não foram elaborados outros estudos que procurem encontrar, especificamente, possíveis alterações significativas em diferentes parâmetros do metabolismo glucídico em gatas domésticas com manifestação de neoplasia mamária. A bibliografia consultada neste trabalho baseia-se, fundamentalmente, em pesquisas realizadas a nível humano, onde se considera existir uma associação significativa entre níveis de glicémia, insulinémia e/ou IGF aumentados e o desenvolvimento de carcinomas mamários (Kabat et al., 2009; Lann & LeRoith, 2008).

Na elaboração do presente estudo optou-se por uma amostra composta apenas por felídeos domésticos, uma vez que esta espécie apresenta uma alta taxa de incidência em diabetes mellitus tipo II, muito semelhante à manifestada em humanos, o que poderia ser uma mais-valia para esta pesquisa (Rand, 2009). Adicionalmente, os tumores mamários em gatos domésticos possuem semelhanças em diversos aspectos com os tumores mamários do homem (Peleteiro, 1994). Por fim, segundo Milland et al.(2005), os carcinomas mamários felinos apresentam normalmente valores mais baixos de receptores de estrogénio em relação a outras espécies o que, possivelmente, pode ser traduzido numa maior independência à sua acção. Deste modo, reduzimos a interferência das hormonas sexuais no estabelecimento de uma eventual relação entre valores aumentados de insulina e o desenvolvimento de carcinomas mamários.

O grupo amostra (N=10), considerado nesta pesquisa, apresentava uma média de idades de 10,6 anos, valor que se encontra compreendido na média considerada normal em gatas com neoplasias mamárias, a qual varia entre os 10 e os 12 anos (Lanna Rutteman & Withrow , 2007).

A condição corporal das 10 gatas analisadas foi considerada normal, o que nos permitiu eliminar a obesidade como um factor causador de confusão na interpretação dos resultados e das possíveis correlações existentes. Esta particularidade tem alguma relevância uma vez que, em diversos estudos realizados no homem, parte da população considerada é obesa, o que torna a condição corporal um parâmetro limitante da análise (Vigneri et al., 2009).

Outro parâmetro limitante de vários estudos consultados é o facto da população amostra ser composta por doentes diabéticos medicados (Gallagher & LeRoith, 2010). No trabalho experimental exposto nenhum dos animais da amostra tinha diagnóstico prévio de diabetes mellitus, ou de outra doença concomitante e, por isso, não houve qualquer interferência medicamentosa na interpretação dos resultados.

A observação de valores normais em todos os hemogramas realizados e em todos os parâmetros bioquímicos medidos aumentou a fiabilidade dos resultados expostos. Os valores de hematócrito alterados poderiam causar erros na leitura dos níveis de glicémia, assim como valores anormais de proteína no sangue poderiam afectar os valores de frutossamina medidos (Knottenbeld, 2005). Estes exames reduziram ainda a possibilidade de existirem outras doenças concomitantes não declaradas, que interfeririam com os resultados e com as possíveis correlações encontradas.

Tal como em Medicina Humana, em Medicina Veterinária é prática corrente a realização de um exame radiográfico torácico pré-cirúrgico, em casos oncológicos. Este exame é importante em pacientes com tumores malignos, pois permite observar a existência de metástases pulmonares, pleurais ou nos linfonodos locais (Lanna et al., 2007). Nos gatos domésticos com neoplasia mamária esta análise é de especial relevância dada a sua elevada malignidade e a grande frequência com que manifesta metástases (Morris & Dobson, 2001). Contudo, no nosso estudo apenas foram reportados dois casos com metástases pulmonares.

Para um estadiamento clínico do tumor, que nos permite prever o grau de malignidade e estabelecer um prognóstico presuntivo antes de obter os resultados histopatológicos, vários têm sido os sistemas propostos, tanto a nível humana como veterinário. Um dos mais usados e adaptado à Medicina Veterinária é o “TNM – Classificação dos tumores em animais domésticos”, elaborado pela World Health Organization (Owen, 1980).

De acordo com esta classificação, metade dos animais da nossa amostra encontrava-se em estadio II, 30% em estadio III e só 20% em estadio IV.

Particularmente, para a avaliação do tumor primário considerámos o seu tamanho e o seu grau de invasão e infiltração. Quanto à sua dimensão, se a massa neoplásica primária apresentar menos de 2 cm, o animal pode sobreviver mais de 3 anos após a cirurgia, se esta tiver mais de 3cm, a sua sobrevivência poderá ser de apenas 4 a 6 meses (Rutteman & Kirpensteijn, 2003). Só 2 dos 10 casos considerados neste estudo apresentavam tumores

primários com 2 cm ou menos, o que corresponde a um melhor prognóstico. Nos restantes casos, os tumores apresentavam dimensões que variavam entre os 3 e os 10 cm e, consequentemente, um período de sobrevivência de apenas 4 a 6 meses.

Todos os animais analisados apresentavam tumores malignos, sendo que, em 8 deles, o grau de malignidade era elevado (grau III). Este dado é coerente com os valores reportado, em que pelo menos 80% dos tumores mamários felinos são malignos (Lanna et al., 2007).

Na interpretação dos níveis de glicémia registados devemos ter em linha de conta que a medição, em todos eles, foi realizada com glucómetro, meio que normalmente apresenta valores de glicémia menos precisos, 18-36 mg/dL inferiores aos obtidos por métodos laboratoriais (Rand & Marshall, 2005). Por outro lado, o recurso ao glucómetro não nos permitiu utilizar uma solução anti-coagulante de fluoreto de oxalato, que previne o consumo de glicose pelos eritrócitos. Isto porque, este anticoagulante pode interferir com a reacção enzimática de alguns destes aparelhos (Knottenbeld, 2005). Contudo, para evitar um consumo relevante de glicose pelas células, o que reduziria os valores de glicémia, realizou-se a sua medição no máximo meia hora após a colheita.

Quando realizada a primeira colheita de sangue, foi possível evitar uma eventual hiperglicémia pós-prandial, uma vez que os animais se encontravam em jejum há pelo menos 12 horas, procedimento pré-cirúrgico obrigatório. O mesmo requisito já não foi possível confirmar na segunda colheita realizada.

Na fase pré-cirúrgica, uma parcela relevante dos casos, 30%, apresentava hiperglicémia, porém, as três amostras consideradas apresentavam todas um valor próximo do valor máximo normal (171 mg/dL). Uma interpretação simplista e linear destes resultados permitir-nos-ia estabelecer um paralelismo com os estudos realizados no homem, que defendem que valores elevados de glicémia podem ter um efeito directo no risco de desenvolver neoplasias mamárias (Alokail et al., 2009). Exemplificativamente, segundo uma pesquisa realizada por Erikson et al.(2011), 6% dos doentes com neoplasia mamária estudados apresentavam hiperglicémia crónica.

Adicionalmente, através da análise destes 3 casos, pudemos concluir que todos eles exibiam valores de insulina inferiores a 2 µUI/mL. Assim, a hipótese de uma possível relação existente entre os valores aumentados de glicémia e o desenvolvimento de tumores mamários pode ser independente da acção da insulina, ao contrário do que é proposto, a nível humano, por Giovannucci et al. (2010). Nesta fase não foi possível estabelecer qualquer correlação entre os níveis de glicémia e os parâmetros considerados para a classificação da gravidade do tumor.

Em T3, apenas 2 casos da amostra (20%) manifestaram hiperglicémia. É do nosso conhecimento, por informações posteriormente obtidas a título excepcional, que um destes dois casos (Mia, caso 3) voltou a apresentar, após um curto intervalo de tempo, um novo

tumor mamário. A evolução clínica da outra gata com hiperglicémia não é conhecida, pelo que não se pode eliminar a hipótese de um novo tumor mamário.

A observação global dos valores de glicémia recolhidos e a comparação feita entre as duas colheitas permitiu-nos constatar que houve uma redução nos valores de glicémia de T1 para T2, na maioria dos animais considerados, embora esta diferença não fosse estatisticamente significativa ($p=0,088$). A diminuição da sua concentração manifestou-se em todos os casos do sub-grupo, excepto no caso 7 (Nucha), o qual apresentava valores anormalmente elevados de insulina, o que terá interferido com os níveis de glicémia presentes, e no caso 1 (Meggy).

Outro dado curioso, obtido por análise estatística, foi o estabelecimento de uma correlação negativa moderada significativa ($r(8) = -0,685$; $p = 0,029$) entre os valores de glicémia pós-cirúrgica e a dimensão do tumor primário extirpado. A explicação mais provável para os diferentes dados anteriormente expostos é o facto das células cancerígenas consumirem grandes quantidades de glicose no seu desenvolvimento. De acordo com Multi et al.(2002), as células malignas aumentam o metabolismo glucídico pela via pentose-fosfatase. Já a hipótese de Warburg (1956), considera que as células cancerígenas utilizam preferencialmente a glicólise na obtenção de energia, pelo que apresentam necessidades de glicose muito superiores às células normais. Assim, após excisão das células neoplásicas, as necessidades glucídicas do organismo diminuiriam, o que pode resultar numa redução dos valores de glicémia numa fase pós-cirúrgica. De modo concordante, quanto maior a massa extirpada, o que corresponde a um número maior de células neoplásicas, com necessidades anormalmente elevado de glicose, maior a redução das necessidades glicémias após a cirurgia.

No entanto, na interpretação destes resultados deve-se ter em consideração a dimensão limitada da amostra e o facto de que a medição de glicémia em gatos não ser o método mais fiável para determinar o valor real de glicose no sangue. O “stress” provocado por um ambiente estranho e a excitação resultante da colheita de sangue pode provocar uma hiperglicémia transitória, por elevação das catecolaminas, principalmente nesta espécie (Knottenbeld, 2005).

Dada a limitação exposta na interpretação dos valores de glicémia obtidos, considerou-se importante realizar também uma medição de frutossamina pré e pós-cirúrgica. A frutossamina, devido ao seu tempo de semi-vida, não é influenciada por rápidas variações nas concentrações de glicémia, sendo necessário a presença de uma hiperglicémia moderada permanente, durante mais de 3 a 5 dias, para que expressem alterações na sua concentração (Hoenig, 2005; Reusch, 2010).

Após observação dos resultados de frutossamina registados, constatamos que houve apenas uma amostra que apresentou um valor ligeiramente aumentado, muito próximo do valor máximo normal ($400 \mu\text{mol/l}$), a qual foi colhida 10 dias depois da cirurgia. Este dado

desvaloriza os valores aumentados de glicose no sangue medidos através do glucómetro, sendo provável que a hiperglicémia moderada observada se devesse ao stress induzido ao animal. Contudo, o animal que apresentava uma frutossamina ligeiramente elevada, pertencia aos 30% da amostra que apresentava hiperglicémia no dia da cirurgia.

Apesar de quase todos os valores se encontrarem dentro do intervalo considerado normal, foi possível estabelecer uma correlação positiva moderada significativa ($r(8) = 0,653$; $p = 0,04$) entre os valores de frutossamina obtidos no dia da cirurgia e o grau de malignidade dos tumores extirpados. Este resultado suporta a ideia proposta de uma relação significativa entre variações na concentração de parâmetros específicos do metabolismo glúcido e a gravidade do tumor, de acordo com a sua malignidade. Porém, aquando da interpretação destes resultados é preciso considerar que a amostra estudada é pequena e o grau de malignidade é elevado em 80% dos tumores analisados no estudo, pelo que serão necessárias mais pesquisas nesta área e em populações de maior dimensão.

As variações observadas entre os níveis de frutossamina registados pré e pós-cirurgicamente também foram analisadas, assim como havia sido realizado para os níveis de glicémia. Assim, foi possível observar um aumento deste parâmetro de T1 para T2, na maioria dos animais considerados. Esta diferença, segundo o teste-t para amostras emparelhadas, apresenta uma significância de $p = 0,056$, muito próximo de $p = 0,05$, pelo que, se a amostra fosse maior, poderia tornar-se significativa. Dos 7 casos considerados neste sub-grupo, apenas a Nucha (caso 7) apresentou um comportamento discordante, com diminuição dos níveis de frutossamina. Esta variação, assim como proposto para os seus valores de glicémia, pode resultar dos níveis anormalmente elevados de insulina.

Como se considera que a frutossamina em gatos tem uma semi-vida de uma a duas semanas (Reusch, 2010), a concentração desta proteína glicada em T2 deverá espelhar os níveis de glicémia no período correspondente à cirurgia. Este aumento poderá ser explicado pelo stress causado por este procedimento, o que se traduz numa maior secreção de cateloaminas para o sangue.

Já os valores obtidos em T3 diminuíram em relação aos valores obtidos em T1, excepto no caso 3 (Mia) em que o valor se manteve igual. Contudo, devemos considerar, uma vez mais, que este animal realizou nova mastectomia pouco tempo depois da última colheita. Neste sub-grupo, os níveis de frutossamina da segunda amostra já corresponderiam aos níveis de glicose sanguíneos após extirpação do tumor, o que, segundo a teoria proposta, pode explicar a sua diminuição.

Através dos resultados apresentados nas duas fases do estudo, referentes aos níveis de insulina no sangue, podemos inferir que este parâmetro está aumentado em 2 das 20 amostras, as quais correspondem ao mesmo animal (Nucha, caso 7). Ou seja, 10% (1/10) dos casos analisados apresentava hiperinsulinémia, o que suporta a possibilidade

considerada de uma associação positiva entre os valores de insulina e o desenvolvimento de neoplasias mamárias (Lawlor et al., 2004).

Ao analisar os 3 parâmetros usados para classificar a gravidade do tumor, é facilmente perceptível que a Nucha apresentava uma das neoplasias mamárias mais graves deste estudo, com um estadio clínico IV, uma dimensão de 7 cm e grau de malignidade III. Apenas um caso (Nina, caso 4) apresentava um tumor com uma classificação clínica tão elevada e com uma dimensão superior ao da Nucha (10cm). Esta constatação torna a possível associação positiva proposta, entre os níveis de insulina e a gravidade do tumor, mais plausível. Além disso, corrobora ainda, de forma indirecta, a ideia de que, níveis aumentados de insulina podem traduzir-se num pior prognóstico, como defendem DeCensi & Gennari (2010).

A relação sugerida, entre os níveis de insulina e o risco e a gravidade de tumores mamários, pode ser devida à acção directa desta hormona ao nível dos receptores de insulina e dos receptores híbridos insulina-IGF, que se encontram anormalmente aumentados no tecido tumoral mamário, ou à sua acção não específica ao nível dos receptores IGF-1 (Papa et al., 1990; Xue & Michels, 2007). Esta associação pode também ser explicada por diferentes acções indirectas. A insulina é capaz de aumentar a produção de IGF (Gallagher & LeRoith, 2010), de aumentar o nível de hormonas esteróides livres (Michels et al., 2003) e, possivelmente, dos receptores de estrogénios nas células mamárias cancerígenas (Lann & LeRoith, 2008).

O facto do nível de insulina presente neste animal ter reduzido para aproximadamente metade, dez dias após a cirurgia, de 20,8 $\mu\text{UI/mL}$ para 10,6 $\mu\text{UI/mL}$, pode ser explicado pela ideia considerada, de uma sobre-expressão dos receptores de insulina pelas células mamárias malignas. Assim, e de acordo com esta hipótese, o número anormalmente elevado destes receptores pode promover o aumento dos níveis séricos de insulina, de forma a dar resposta ao consumo acrescido desta hormona pelas células neoplásicas. Ao remover a massa tumoral, eliminamos as exigências suplementares de insulina promovidas por este tecido, as necessidades séricas desta hormona diminuem e, consequentemente, o pâncreas reduz a sua libertação até o organismo estabelecer um novo equilíbrio. Contudo, para dar suporte a esta teoria seria necessário um estudo mais amplo, visto que apenas foi possível analisar as variações de insulina num único caso.

Em relação aos restantes 9 animais estudados, em ambas as amostras recolhidas, registaram-se concentrações de insulina inferiores a 2 $\mu\text{UI/mL}$, valor que se encontra abaixo do nível de referência genericamente proposto. No entanto, a concordância deste resultado, a inexistência de doenças concomitantes na nossa amostra e os níveis normais ou moderadamente elevados de glicémia apresentados permitem-nos considerar que estes níveis baixos de insulina podem ser normais nesta espécie.

Para além dos parâmetros anteriormente considerados, teria sido pertinente medir também os níveis de IGF-1 no sangue destes animais, um factor considerado relevante, por diversos autores, na evolução da neoplasia mamária. Segundo um estudo retrospectivo realizado a nível humano, observou-se que a metade do grupo amostra com os níveis mais elevados de IGF apresentava um risco 28% superior de desenvolver tumores mamários (Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, 2010). Paralelamente, Nunez et al. (2006) observou que ratos com deficiência em IGF e GH apresentavam um risco tumoral diminuído.

Os valores de IGF obtidos seriam também úteis para determinar a possível influência deste parâmetro na associação considerada entre a hiperinsulinémia e o desenvolvimento cancerígeno.

Embora a maioria da literatura proponha, unicamente, que a presença de alterações no metabolismo glucídico contribui para o desenvolvimento de tumores mamários, alguns consideram possível a hipótese de uma associação inversa (Lipscombe et al., 2006b). Esta ideia, segundo a qual a manifestação de neoplasias mamárias pode provocar alterações no metabolismo glucídico, também não pode ser rejeitada neste estudo. Tal facto deve-se a que os níveis de glicémia e insulinémia do grupo amostra, antes da apresentação do tumor, são desconhecidos, e porque não houve um acompanhamento posterior dos casos. Adicionalmente, o facto da glicose, da frutossamina e da insulina terem apresentado variações nas suas concentrações, após remoção cirúrgica do tumor, sustenta esta hipótese.

Por isso, futuros estudos, mais amplos, necessitariam de um acompanhamento dos casos mais prolongado após a cirurgia e de uma terceira medição dos parâmetros glucídicos considerados. Poderia ainda ser interessante considerar, se possível, um segundo grupo amostra, com diagnóstico prévio de diabetes mellitus, no qual se pudesse ter acesso aos valores de glicémia e frutossamina antes do diagnóstico de tumor mamário.

3.5. CONCLUSÃO

O estudo realizado demonstra uma incidência, ainda que baixa, de níveis elevados de glicémia e insulinémia em gatas com neoplasia mamária, e estabelece correlações significativas entre os níveis de glicose no sangue e diferentes parâmetros usados na classificação da gravidade do tumor.

A percentagem de casos que manifestava hiperglicémia numa fase pré-cirúrgica foi na ordem dos 30%. Contudo, a confirmação destes resultados, através da medição de frutossamina realizada, não se verificou. Ao cruzar os resultados destes dois parâmetros, apenas 10% do grupo amostra manifestava uma hiperglicémia concordante com os níveis ligeiramente elevados de frutossamina. Muito embora esta percentagem seja baixa, não deve por isso deixar de ser considerada, uma vez que se encontra na ordem dos valores propostos em estudos a nível humano.

De acordo com os valores de frutossamina registados neste estudo foi possível estabelecer uma correlação positiva moderada significativa entre os seus níveis pré-cirúrgicos e a malignidade do tumor. Contudo, dado o número pequeno da amostra e a elevada frequência de uma malignidade de grau III, seriam necessárias mais pesquisas para confirmar esta correlação.

Com base nos valores registados após a excisão do tumor, obteve-se uma correlação negativa moderada significativa entre os níveis de glicémia e a dimensão da massa tumoral removida. Esta correlação suporta a hipótese considerada de um anormal consumo excessivo de glicémia pelas células neoplásicas, com consequente redução dos níveis séricos de glicose após a sua remoção. Esta teoria é ainda corroborada pela observação da redução dos valores de glicémia, de T1 para T2, e de frutossamina, de T1 para T3.

Em relação aos níveis de insulina, 10% da população amostral (1 caso) apresentava uma hiperinsulinémia marcada. Esta percentagem, ainda que modesta, suporta a ideia considerada de uma associação positiva entre os níveis aumentados de insulina e a manifestação de neoplasias mamárias. O facto do único animal com hiperinsulinémia apresentar o segundo tumor mais agressivo da amostra, torna mais válida a hipótese proposta de uma relação positiva entre os níveis séricos desta hormona e a gravidade do tumor.

Observou-se ainda que, a concentração de insulina reduziu para metade neste animal, após remoção da massa tumoral. Esta constatação traduz, possivelmente, uma sobre-expressão dos receptores de insulina pelas células neoplásicas, com um consequente aumento das necessidades séricas desta hormona na presença do tumor e posterior redução, após extirpação do mesmo.

Por fim, dado o conjunto de resultados registados neste trabalho e a ausência de informações anteriores à apresentação da massa neoplásica, a hipótese de uma correlação inversa mantém-se em aberto.

As conclusões apresentadas e a ausência, ou reduzido número, de trabalhos realizados sobre este tema, nesta espécie, realçam o seu interesse e sugerem a necessidades de futuras e mais completas pesquisas nesta área.

3.6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Na elaboração deste estudo deparámo-nos com algumas limitações, por razões de ordem prática, temporal e logística.

A primeira e a mais relevante foi o número reduzido de casos que compõem o grupo amostra. Se o tempo disponível para a realização desta pesquisa fosse maior, e se tivesse sido possível realizar a colheita pós-cirúrgica em todas as gatas com tumores mamários às quais se teve acesso, esta amostra poderia ter sido bastante maior.

Outra dificuldade importante deste trabalho experimental, comparativamente com os realizados a nível humano, é a pouca fiabilidade que se dá aos valores de glicémia medidos em gatos no momento da consulta. A medição dos níveis de frutamina procurou colmatar esta limitação, mas implicou custos acrescidos.

Para valorizar este trabalho e validar os valores registados, teria sido útil realizar mais uma colheita pré-cirúrgica e uma colheita pós-cirúrgica. Contudo, para que isso fosse possível, seria necessária uma grande disponibilidade por parte dos donos e uma outra capacidade logística.

Dado o período relativamente curto de tempo para a realização deste trabalho, não foi exequível a realização de um acompanhamento posterior dos casos. As informações daí decorrentes seriam úteis para tentar estabelecer uma correlação entre os parâmetros glucídicos e o prognóstico da doença.

Adicionalmente, um estudo mais prolongado e com mais medições pré e pós-cirúrgicas poderia ajudar também a determinar se as correlações propostas se deviam a uma associação directa ou inversa.

Por último, dados os custos implicados, não foi possível medir os níveis de IGF-1 das amostras consideradas neste estudo. Este seria um dado relevante, uma vez que se considera que este parâmetro é importante na eventual associação entre alterações no metabolismo glucídico e o desenvolvimento de neoplasias mamárias.

III. BIBLIOGRAFIA

- Abbasi, M., Tarafdari, A., Esteghamati, A., Vejdani, K. & Nakhjavani, M. (2010). Insulin resistance and breast carcinogenesis: a cross-sectional study among Iranian women with breast mass [abstract]. *Metabolic Syndrome and related Disorders*, 8(5), 411-416.
- Alokail, M.S., Al-Daghri, N.M., Al-Attas, O.S. & Hussain, T. (2009) Combined effects of obesity and type 2 diabetes contribute to increased breast cancer risk in premenopausal women. *Cardiovascular diabetology*, 8(33).
- Aronoff, S.L., Berkowitz, K., Shreiner, B. & Want, L. (2004). Glucose metabolism and regulation: Beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17,183-189.
- Bates,H.E., Bain, P.J., Krimer, P.M. & Latimer,K.S.(2003). Fructosamine measurement in diabetic dogs and cats. *Veterinary clinical pathology clerkship program*, class of 2003. Acedido em Jul. 17, 2010, disponível em: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/bates/index.php>
- Bender, D.A. & Mayes, P.A. (2006a). Gluconeogenesis & the control of blood glucose. In R.K. Murray, D. K. Granner & V. W. Rodwell, *Harper's illustrated biochemistry*. (27th ed.). (pp.132-176). USA: McGraw-Hill companies.
- Bender, D.A. & Mayes, P.A. (2006b). Glycolysis & the oxidation of pyruvate. In R.K. Murray, D. K. Granner & V. W. Rodwell, *Harper's illustrated biochemistry*. (27th ed.). (pp.151-158). USA: McGraw-Hill companies.
- Bender, D.A. & Mayes, P.A. (2006c). Metabolism of glycogen. In R.K. Murray, D. K. Granner & V. W. Rodwell, *Harper's illustrated biochemistry*. (27th ed.). (pp.132-176). USA: McGraw-Hill companies.
- Bender, D.A. & Mayes, P.A. (2006d). Overview of metabolism & the provision of metabolic fuels. In R.K. Murray, D. K. Granner & V. W. Rodwell, *Harper's illustrated biochemistry*. (27th ed.). (pp.132-176). USA: McGraw-Hill companies.
- Berg, J. M, Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2004). *Bioquímica*. (5th ed.). Rio de Janeiro: Guanabara
- Bloom, H.J.G & Richardson, W.W. (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 11, 359-377
- Berne, R.M. & Levy, M.N. (1993). *Physiology*. (3rd ed.). Sidney: Mosby, International edition.
- Call, R., Grimsley, M., Cadwallader, L., Cialone, L., Hill, M., Hreish, V., King, S.T. & Riche, D.M. (2010). Insulin- Carcinogen or mitogen? : Preclinical and clinical evidence from prostate, breast, pancreatic and colorectal cancer research. *Postgraduate Medicine Journal*, 122(3), 158-165.
- Chaves, J. & Saif, M.W. (2011). IGF system in cancer: from bench to clinic [abstract]. *Anti-cancer drugs*, 22(3), 206-212.
- Cleary, M.P., Grossmann, M.E. & Ray, A. (2010). Effect of obesity on breast cancer development. *Veterinary Pathology*,47(2), 202-213.
- DeCensi, A. & Gennari, A. (2010). Insulin breast cancer connection: Confirmatory data set the stage for better care. *Journal of clinical oncology*, 28, 1-3.

- Erickson, K., Patterson, R.E., Flatt, S.W., Natarajan, L., Parker, B.A., Heath, D.D., Laughlin, G.A., Saquib, N., Rock, C.L. & Pierce, J.P. (2011). Clinically defined type 2 diabetes mellitus and prognosis in early-stage breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 29(1), 54-60.
- Erickson, K.D., Pierce, J.P., Patterson, R.E., Reid, T.R., Natarajan, L., Flatt, S., Parker, B.A. & Heath, D. (2010). Type II diabetes and breast cancer [abstract]. *Journal of Clinical Oncology*, 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition), 28 (15).
- Evans, E. W. & Duncan, J.R. (2003). Proteins, lipids and carbohydrates. In K.S. Latimer, E.A Mahaffey & K.W. Prasse, *Veterinary laboratory medicine clinical pathology* (4th ed.). (pp.162-192). Iowa: Blackwell Publishing.
- Fan, T.M. (2007). Feline mammary tumors: current and future therapies. Proceeding of the North American Veterinary Conference, Jan., 13-27, Orlando, Florida. Acedido em Out., 14, 2010, em <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/277.asp?LA=1>
- Felman, E.C. & Nelson, R.W. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction* (3rd ed.). Missouri: Saunders.
- Gallagher, E.J. & LeRoith, D. (2010). Insulin, insulin resistance, obesity and cancer. *Current diabetes reports*, 10, 93-100.
- Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., Regensteiner, J.G. & Yee, D. (2010). Diabetes and cancer : A consensus report. *CA: A Cancer journal for Clinicians*, 60, 207-221.
- Goodman, H.M. (1980). The pancreas and regulation of metabolism. In V. B. Mountcastle (ed.), *Medical physiology*. (14th ed.). (pp.1638-1673). Missouri: C.V. Mosby Company
- Goodwin, P.J., Ennis, M., Pritchard, K.I., Trudeau, M.E., Koo, J., Madarnas, Y., Hartwick, W., Hoffman, B. & Hood, N. (2002). Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study. *Journal of Clinical Oncology*, 20 (1), 42-51.
- Goodwin, P.J., Ennis, M., Bahl, M., Fantus, I.G., Pritchard, K.I., Trudeau, M.E., Koo, J. & Hood, N. (2008). High insulin levels in newly diagnosed breast cancer patients reflect underlying insulin resistance and are associated with components of the Insulin Resistance Syndrome. *Breast Cancer Research and Treatment*, 114, 517-525.
- Graves, T.K. (2010a). Insulin resistance in cats. Proceeding of the International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians, May 29-31, Rimini, Itália. Acedido em Dez., 29, 2010, em <http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2010/Graves3.pdf?LA=1>
- Graves, T.K. (2010b). The endocrinology of obesity. Proceeding of the International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians, May 29-31, Rimini, Itália. Acedido em Dez., 29, 2010, em <http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2010/Graves4.pdf?LA=1>
- Greco, D. & Stabenfeldt, G.H. (2004). Endocrinologia. In J.G. Cunningham, *Tratado de fisiologia veterinária*. (3rd ed.). (pp.131-181). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

- Grote, V.A., Becker, S. & Kaaks, R. (2010). Diabetes mellitus type 2: An independent risk factor for cancer? [abstract] *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 118(1), 4-8.
- Gunter, M.J., Hoover, D.R., Yu, H., Wassertheil-Smoller, S., Rohan, T.E., Manson, J. E., Li, J., Ho, G.Y.F., Xue, X. , Anderson, G.L., Kaplan, R.C., Harris, T.G., Howard, B.V., Wylie-Rosett, J., Burk, R.D. & Strickler, H.D. (2009). Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(1), 48-60.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2000). *Textbook of medical physiology*. (10th ed.). Pennsylvania: Saunders company.
- Heuson, J.C & Legros,N (1972). Influence of Insulin Deprivation on Growth of the 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Mammary Carcinoma in Rats Subjected to Alloxan Diabetes and Food Restriction. *Cancer research*, 32, 226-232
- Hoenig, M. (2005). Diabetes mellitus and testing in the dog and cat. In Proceedings 56th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 40th Annual Meeting of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP):Boston, Massachusetts, USA. Acedido em Nov, 20, 2010, em <http://www.ivis.org/proceedings/acvp/2005/Hoenig1/chapter.asp?LA=1>
- Irwin, M.L., Duggan, C., Wang, C., Smith, A.W., McTiernan, A., Baumgartner, R.N., Baumgartner, K.B., Bernstein, L. & Ballard-Barbash, R. (2011) Fasting C-peptide levels and death resulting from all causes and breast cancer: The health, eating, activity, and lifestyle study. *Journal of Clinical Oncology*, 29(1), 47-53
- Jiralerspong, S., Palla, S.L., Giordano, S.H., Meric-Bernstam, F., Liedtke, C., Barnett, C.M., Hsu, L., Hung, M.C., Hortobagyi, G.N. & Gonzalez-Angulo, A.M. (2009). Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (20), 3297-3302.
- Kabat, G.C., Kim, M., Caan, B.J., Chebowski, R.T., Gunter, M.J., Ho, G.Y.F., Rodriguez, B.L., Shikany, J.M., Vitolins, M.Z. & Rohan, T.E. (2009). Repeat measures of serum glucose and insulin in relation to postmenopausal breast cancer. *International journal of cancer*, 125, 2704-2710.
- Kaneko, J.J.(1997). Carbohydrate metabolism and its diseases. In J.J. Kaneko, J.W. Harvey & M.L.Bruss (ed.), *Clinical biochemistry of domestic animals*. (5th ed.). (pp. 45-81) U.K.: Academic press.
- Knottenbeld, C. (2005). Laboratory evaluation of hyperglycaemia and hypoglycaemia. In E. Villiers & L. Blackwood (ed.), *BSAVA Manual of canine and feline clinical Pathology*. (2nd ed.) England : BSAVA.
- Lann, D. & LeRoith, D. (2008). The role of endocrine insulin-like growth factor-I and insulin in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 13, 371-379.
- Lanna, S.E., Rutteman, G.R. & Withrow, S.J. (2007). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Small animal clinical oncology* (4rd ed.).(pp.619-636). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Larsson, S.C., Mantzoros, C.S. & Wolk, A. (2007). Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer*, 121, 856-862.

- Lawlor, D.A., Smith, G.D. & Ebrahim, D.S. (2004). Hiperinsulinaemia and increased risk of breast cancer: findings from the British women's heart and health study. *Cancer causes and control*, 15, 267-275.
- Libby, G., Donnelly, L.A., Donnan, P.T., Alessi, D.R., Morris, A.D. & Evans, J.M. (2009). New users of metformin are at low risk of incident cancer: A cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32(9), 1620-1625.
- Lipscombe, L.L., Goodwin, P.J., Zinman, B., McLaughlin, J.R. & Hux, J.E. (2006a). Diabetes mellitus and breast cancer: a retrospective population-based cohort study. *Breast cancer research and treatment*, 98, 349-356.
- Lipscombe, L.L., Goodwin, P.J., Zinman, B., McLaughlin, J.R. & Hux, J.E. (2006b). Increased prevalence of prior breast cancer in women with newly diagnosed diabetes. *Breast cancer research and treatment*, 98, 303-309.
- Martin, P.A. & Crump, M. H. (2003). The endocrine pancreas. In M. H. Pireda (ed.), *McDonald's Veterinary endocrinology and reproduction*. (5th ed.). (pp.141-163). Iowa: Iowa state press.
- Meyer, D.J, Coles, E.H. & Rich, L.J. (1992). *Veterinary laboratory medicine interpretation and diagnosis*. Philadelphia: W.B. Saunders company.
- Michels, K.B., Solomon, C.G., Hu, F.B., Rosner, B.A., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., Manson, J.E. & Nurses' Health Study (2003). Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study. *Diabetes Care*, 26(6), 1752-1758.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I. & Poli, A. (2005). Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Veterinary Science*, 79, 225-232.
- Millanta, F., Calandrella, M., Vannozzi, I. & Poli, A. (2006). Steroid hormone receptors in normal, dysplastic and neoplastic feline mammary tissues and their prognostic significance. *Veterinary record*, 158 (24), 821-824.
- Mink, P.J., Shahar, E., Rosamond, W.D., Alberg A.J., and Folsom A.R. (2002). Serum insulin and glucose levels and breast cancer incidence: The atherosclerosis risk in communities study. *American Journal of Epidemiology*, 156 (4), 349-352.
- Misdorp, W. (2002) Tumors of the mammary gland. In D.J.Meuten, *Tumors in domestic animals*. (4th ed.). (pp 575-606). Iowa: Blackwell Publishing company.
- Morris, J. & Dobson, J. (2001). Mammary gland. In J. Dobson & J. Morris (Eds.), *Small animal oncology* (pp.184-191). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Müssig, K., Staiger, H., Kantartzis, K., Fritsche, A., Kanz, L. & Häring, H.U. (2010). Diabetes, insulin, insulin analogues, and cancer. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 135 (18), 924-929.
- Muti, P., Quattrin, T., Grant, B.J.B., Krogh, V., Micheli, A., Schuñemann, H.J., Ram, M., Freudenheim, J.L., Sieri, S., Trevisan, M. & Berrino, F. (2002). Fasting glucose is a risk factor for breast cancer: A prospective study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 11, 1361-1368.

- Nagle, J.A., Ma, Z., Byrne, M.A., White, M.F. & Shaw, L.M. (2004) Involvement of insulin receptor substrate 2 in mammary tumor metastasis. *Molecular and cellular biology*, 24 (22), 9726-9735.
- Nelson, D.L. & Cox, M.C (2008). *Lehninger Principles of biochemistry*. (5th ed.). N.Y: W.H. Freeman and Company.
- Nelson, R.W., Turnwald, G.H. & Willard, M. (1999). Endocrine, metabolic and lipid disorders. In M.D.Willard, H. Tvedten & G. Turnwald, *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. (3rd ed.). (pp. 136-171) Pennsylvania: Saunders Company.
- Novosyadlyy, R., Lann, D. E., Vijayakumar, A., Rowzee, A., Lazzarino, D. A., Fierz, Y., Carboni, J. M., Gottardis, M.M., Pennisi, P. A., Molinolo, A.A., Kurshan, N., Mejia, W., Santopietro, S., Yakar, S., Wood, T.L., & LeRoith, D. (2010). Insulin-mediated acceleration of breast cancer development and progression in a nonobese model of type 2 diabetes. *Cancer research*, 70(2), 741-751.
- Nunez, N.P., Oh, W.J., Rozenberg, J., Perella, C., Anver, M., Barrett, J.C., Perkins, S.N., Berrigan, D., Moitra, J., Varticovski, L., Hursting, S.D. & Vinson, C. (2006). Accelerated tumor formation in a fatless mouse with type 2 diabetes and inflammation. *Cancer Research*, 66(10), 5469-5476.
- Owen, L.N. (1980). World Health Organization clinical stage classification, TNM classification of tumors in domestic animals. In S.J. Withrow & E.G. MacEwen (Eds.), *Clinical Veterinary Oncology*. (3rd ed.). (pp.461; 469-470). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Papa, V., Reese, C.C., Brunetti, A., Vigneri, R., Siiteri, P.K. & Goldfine, I.D. (1990). Progestins increase insulin receptor content and insulin stimulation of growth in human breast carcinoma cells. *Cancer Research*, 50 (24), 7858-7862.
- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, LXXXIX(509), 10-34.
- Poliak, M. (2009) Energy metabolism, cancer risk, and cancer prevention. In Senn, H., Kapp, U. & Otto, F. (ed.), *Cancer prevention II (Recent results in cancer research 181)*. (pp.51-54). Heidelberg: Springer.
- Rand, J. & Marshall, R. (2005). Feline diabetes melitus. In C.T. Mooney & M.E. Peterson (ed.), *BSAVA Manual of canine and feline Endocrinology*. (3rd ed.) (pp.129-141). England : BSAVA
- Rand, J.(2007). Feline diabetes mellitus: Pathologogenesis and principles of therapy. Proceedings of the North American Veterinary Conference, Jan 13-27, Orlando, Florida. Acedido em Jan, 28, 2011, em <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/130.asp?LA=1>
- Rand, J.S. (2009). Feline diabetes mellitus. In Bonaguna, J. D. & Twedt, D.C., *Kirk's current veterinary therapy XIV*. (14th ed). (pp.199-204). Missouri: Saunders Elsevier.
- Rapp, K., Schroeder, J., Klenk, J., Ulmer, H., Concin, H., Diem, G., Oberaigner, W. & Weiland, S. K.(2006). Fasting blood glucose and cancer risk in a cohort of more than 140,000 adults in Austria. *Diabetologia*, 49(5), 945-952
- Reusch, C. (2010) Feline diabetes melittus. In Ettinger S.J. & Feldman E.C. (eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7th ed.) (pp.1796-1816) Philadelphia: WB Saunders.

- Rijnberk, A. & Kooistra, H.S. (2010) *Clinical endocrinology of dogs and cats* (2nd) Hannover : Schlütersche,
- Rutteman, G.R. & Kirpensteijn, J. (2003). Tumours of mammary glands. In J.M.Dobson & B.D. Lascelles (ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. (2nd ed.) (pp.234-239) England : BSAVA
- Sackheim, I. & Lehman D. D. (2001). *Química e bioquímica para ciências biomédicas*. (8th ed.). Brasil: Manole.
- Schnarr, B., Strunz, K., Ohsam, J., Benner, A., Wacker, J. & Mayer, D.(2000). Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer. *International Journal of Cancer*, 89 (6), 506–513.
- Scott, M. A. & Stockham, S. L. (2002). *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Iowa : Blackwell Publishing Company.
- Shimizu, C., Hasegawa, T., Tani, Y., Takahashi, F., Takeuchi, M., Watanabe, T., Ando, M., Katsumata, N. & Fujiwara, Y. (2004). Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: Immunohistochemical analysis. *Human Pathology*, 35 (12), 1537-1542.
- Stattin, P., Björ, O., Ferrari, P., Lukanova, A., Lenner, P., Lindahl, B., Hallmans, G. & Kaaks, R.(2007). Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. *Diabetes Care*, 30 (3), 561-567.
- The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group (2010). Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *The Lancet Oncology*, 11(6), 530 – 542.
- Toniti, W., Buranasinsup, S., Kongcharoen, A., Charoonrut, P., Puchadapirom, P. & Kasornrorkbua, C. (2009). Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors [abstract]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 10 (5), 907-911.
- Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G. & Vigneri, R. (2009) Diabetes and cancer. *Endocrine-related cancer*, 16, 1103-1123.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Wolf, I. & Rubinek, T. (2008). Diabetes mellitus and breast cancer. In Masur, K., Thévenod, F. & Zänker, K.S. (ed.), *Diabetes and cancer. Epidemiological evidence and molecular links*. (pp 97–113) Basel: Karger.
- Wolf, I., Sadetzki, S., Gluck, I., Oberman, B., Ben-David, M., Papa, M.Z., Catane, R. & Kaufman, B. (2006). Association between diabetes mellitus and adverse characteristics of breast cancer at presentation. *European journal of cancer*, 42, 1077-1082.
- Wu, A.H., Yu, M.C., Tseng, C., Stanczyk, F.Z. & Pike, M.C. (2007). Diabetes and risk of breast cancer in Asian-American women. *Carcinogenesis*, 28 (7), 1561-1566.
- Wysocki, P.J. & Wierusz-Wysocka, B. (2010) Obesity, hyperinsulinemia and breast cancer: novel targets and a novel role for metformin [abstract]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(4), 509-519.

- Xue, F. & Michels, K. B. (2007). Diabetes, metabolic syndrome, and breast cancer: a review of the current evidence. *The American journal of clinical nutrition*, 86(suppl), 823S-835S.
- Yanochko, G.M. & Eckhart W. (2006). Type I insulin-like growth factor receptor over-expression induces proliferation and anti-apoptotic signaling in a three-dimensional culture model of breast epithelial cells. *Breast cancer research*, 8, R18. Acedido em Jun. 26, 2010, disponível em: <http://breast-cancer-research.com/content/8/2/R18>

IV. ANEXOS

Anexo 1- Registo dos resultados totais da população amostra deste estudo.

N	Nome	Glic1 mg/dl	Frut1 μmol/L	Ins2 μUI/ml	Glic2 mg/dl	Frut2 μmol/L	Ins2 μUI/ml	Grau	Dimensão (cm)	TNM
1	Meggy	84	257	2	136	270	<2	3	3	2
2	Sol	139	232	2	186	158	<2	3	3	2
3	Mia	98	193	2	224	192	<2	3	1,5	2
4	Nina	173	180	2	67	229	<2	3	10	4
5	Nuska	171	253	2	129	415	<2	3	5	3
6	Susie	97	316	2	71	202	<2	3	6	3
7	Nucha	72	216	20,8	84	197	10,6	3	7	4
8	Tareca	177	143	2	96	197	<2	1	3	2
9	Luna	129	176	2	103	192	<2	2	2	2
10	Micky	132	230	2	107	247	<2	3	5	3

Anexo 2 - Correlações de Pearson (r) não significativas entre os níveis de glicémia e a gravidade do tumor.

Tabela 1. Correlação entre a glicémia pré-cirúrgica e a classificação TNM do tumor.

Classificação Clínica_TNM		
Glicémia pré-cirúrgica	Correlação de Pearson	-,001
	p	1,00
	N	10

Tabela 2. Correlação entre a glicémia pré-cirúrgica e a dimensão do tumor.

Dimensão_Tumor		
Glicémia pré-cirúrgica	Correlação de Pearson	,16
	P	,65
	N	10

Tabela 3. Correlação entre a glicémia pré-cirúrgica e a classificação histopatológica do tumor.

Classificação Histopatológica		
Glicémia pré-cirúrgica	Correlação de Pearson	-,43
	<i>p</i>	,21
	N	10

Tabela 4. Correlação entre a glicémia pós-cirúrgica e a classificação histopatológica do tumor.

Classificação Histopatológica		
Glicémia pós-cirúrgica	Correlação de Pearson	,21
	<i>P</i>	,55
	N	10

Tabela 5. Correlação entre a glicémia pós-cirúrgica e a classificação TNM do tumor.

Classificação Clínica_TNM		
Glicémia pós-cirúrgica	Correlação de Pearson	-,62
	<i>P</i>	,06
	N	10

Anexo 3 - Correlações de Pearson (*r*) não significativas entre os níveis de frutossamina e a gravidade do tumor.

Tabela 1. Correlação entre a frutossamina pré-cirúrgica e a classificação TNM do tumor.

Classificação Clínica_TNM		
Frutossamina pré-cirúrgica	Correlação de Pearson	,15
	<i>P</i>	,69
	N	10

Tabela 2. Correlação entre a frutossamina pré-cirúrgica e a dimensão do tumor.

		Dimensão_Tumor
Frutossamina pré-cirúrgica	Correlação de Pearson	,15
	<i>P</i>	,69
	N	10

Tabela 3. Correlação entre a frutossamina pós-cirúrgica e a classificação TNM do tumor.

		Classificação Clínica_TNM
Frutossamina pós-cirúrgica	Correlação de Pearson	,20
	<i>P</i>	,58
	N	10

Tabela 4. Correlação entre a frutossamina pós-cirúrgica e a dimensão do tumor.

		Dimensão_Tumor
Frutossamina pós-cirúrgica	Correlação de Pearson	,16
	<i>P</i>	,65
	N	10

Tabela 5. Correlação entre a frutossamina-pós-cirúrgica e a classificação histopatológica do tumor.

		Classificação Histopatológica
Frutossamina pós-cirúrgica	Correlação de Pearson	,24
	<i>P</i>	,51
	N	10

Anexo 4 – Restantes Testes *t*-Student para amostras emparelhadas, considerados no estudo.

Tabela 1. Testes *t*-Student para amostras emparelhadas entre os valores de glicémia pré e pós-cirúrgicas, na amostra total.

	T	Graus de liberdade	Significância
Glicémia pré e pós-cirúrgica	,32	9	,38

Tabela 2. Testes *t*-Student para amostras emparelhadas, entre os valores de frutossamina pré e pós-cirúrgicas, na amostra total.

	T	Graus de liberdade	Significância
Frutossamina pré e pós-cirúrgica	-,44	9	,34

Tabela 3. Testes *t*-Student para amostras emparelhadas, entre os valores de glicémia em T1 e T2, na amostra parcial.

	T	Graus de liberdade	Significância
Glicémia em T1 e T 2	1,53	6	,09